

**ANA CRISTINA DOS SANTOS**

**MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS NOS EFEITOS DA  
BARDANA (*Arctium lappa* L.) SOBRE O TRATO  
GASTROINTESTINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Consuelo Andrade Marques.

**CURITIBA  
2007**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo.

Aos pais, Varlei e Nilton, pelo incentivo, apoio e dedicação, os quais foram fundamentais para que esta conquista se realizasse.

À orientadora, professora Dr<sup>a</sup> Maria Consuelo Andrade Marques, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Gastro e pelo apoio e paciência durante este período.

Ao professor Dr Moacir Geraldo Pizolatti, pelo apoio fitoquímico.

Às colaboradoras efetivas, Msc Cristina Setim Freitas e Msc Cristiane Hatsuko Baggio, pelos conhecimentos e ajuda dispensados.

À equipe do Lab 81 A, Bárbara, André, Fran e Ju, os quais, junto com as “Crises”, participaram diretamente neste trabalho e, além disso, proporcionaram momentos e gargalhadas memoráveis.

Por fim, agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XVI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
1.1.1 <i>ARCTIUM LAPPA</i> L. ....	5
1.1.2 FISILOGIA GÁSTRICA.....	10
1.1.2.1 Anatomo-fisiologia.....	13
1.1.2.2 Úlcera gástrica.....	19
1.1.2.2a Etiopatogenia.....	19
<b>2 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>29</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 MATERIAL.....</b>	<b>30</b>
3.1.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	30
3.1.1.1 Origem .....	30
3.1.1.2 Preparação do extrato.....	30
3.1.2 ANIMAIS .....	31
3.1.3 DROGAS, REAGENTES, SOLVENTES E SAIS .....	31
3.1.4 EQUIPAMENTOS .....	32
<b>3.2 METODOLOGIA .....</b>	<b>32</b>
3.2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA.....	33
3.2.1.1 Lesões gástricas induzidas por etanol (ROBERT <i>et al.</i> , 1979).....	33
3.2.1.1a Avaliação das lesões gástricas nos modelos agudos.....	33

3.2.1.2 Lesões gástricas induzidas por ácido acético (TAKAGI <i>et al.</i> , 1969) .....	33
3.2.1.2a Avaliação das lesões gástricas nos modelos crônicos .....	34
3.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	34
3.2.2.1 Estudo <i>in vitro</i> da atividade seqüestradora de radicais livres (DPPH) .....	34
3.2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA ÁCIDA .....	34
3.2.3.1 Ligadura de Píloro (SHAY <i>et al.</i> , 1945).....	34
3.2.3.2 Estudo da atividade na H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ATPase <i>in vitro</i> .....	35
3.2.3.2a Isolamento das vesículas gástricas de coelho .....	35
3.2.3.2b Purificação da H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ATPase de coelho .....	36
3.2.3.2c Ensaio da atividade enzimática da H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ATPase .....	36
3.2.4 AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL .....	37
3.2.4.1 Esvaziamento gástrico .....	37
3.2.4.2 Trânsito intestinal .....	37
<b>3.3 EXPRESSÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>38</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DOS EXTRATOS DA BARDANA .....</b>	<b>39</b>
4.1.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO CONTRA AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS DE FORMA AGUDA .....	39
4.1.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO CONTRA AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS DE FORMA AGUDA.....	39
4.1.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO CONTRA AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS DE FORMA CRÔNICA .....	41
4.1.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTETORA DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO CONTRA AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS DE FORMA CRÔNICA.....	42
<b>4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DA BARDANA .....</b>	<b>43</b>
4.2.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO ATRAVÉS DE METODOLOGIA <i>IN VITRO</i> .....	43
4.2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO ATRAVÉS DE METODOLOGIA <i>IN VITRO</i> .....	44

<b>4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA ÁCIDA DOS EXTRATOS DA BARDANA .....</b>	<b>45</b>
4.3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA ÁCIDA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO .....	45
4.3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA ÁCIDA DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO ATRAVÉS DE METODOLOGIA <i>IN VIVO</i> .....	47
4.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA ÁCIDA DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO ATRAVÉS DE METODOLOGIA <i>IN VITRO</i> .....	51
4.3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA ÁCIDA DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO ATRAVÉS DE METODOLOGIA <i>IN VITRO</i> .....	52
<b>4.4 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DA BARDANA SOBRE A MOTILIDADE GASTROINTESTINAL.....</b>	<b>53</b>
4.4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO SOBRE A MOTILIDADE GASTROINTESTINAL.....	53
4.4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO SOBRE A MOTILIDADE GASTROINTESTINAL.....	55
<b>4.5 ATIVIDADES DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO .....</b>	<b>59</b>
4.5.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA ÁCIDA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO ATRAVÉS DE METODOLOGIA <i>IN VITRO</i> .....	59
4.5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO ATRAVÉS DE METODOLOGIA <i>IN VITRO</i> .....	61
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: <i>Arctium lappa</i> L. ....	6
Figura 1.2: Raízes e folhas da <i>Arctium lappa</i> L. ....	7
Figura 1.3: <i>Arctium minus</i> B. ....	7
Figura 4.1: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre as lesões gástricas induzidas pelo etanol 80%, em ratos. ....	39
Figura 4.2: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre as lesões gástricas induzidas pelo etanol 70%, em ratos ....	40
Figura 4.3: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre as lesões gástricas induzidas pelo etanol 80%, em ratos ....	41
Figura 4.4: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre as lesões gástricas crônicas, induzidas pelo ácido acético 20%, em ratos ....	42
Figura 4.5: Efeito do extrato bruto etanólico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre as lesões gástricas crônicas, induzidas pelo ácido acético 20%, em ratos ....	43
Figura 4.6: Efeito antioxidante do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o DPPH, <i>in vitro</i> . ....	44
Figura 4.7: Efeito antioxidante do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o DPPH, <i>in vitro</i> . ....	45
Figura 4.8: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a secreção gástrica, em ratos. ....	46
Figura 4.9: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a acidez da secreção gástrica, em ratos. ....	46
Figura 4.10: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a acidez da secreção gástrica, em ratos. ....	47
Figura 4.11: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a secreção gástrica, em ratos.....	48

Figura 4.12: Efeito da administração vo do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a acidez da secreção gástrica, em ratos...	48
Figura 4.13: Efeito da administração vo do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a secreção gástrica, em ratos.....	49
Figura 4.14: Efeito da administração ip do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a acidez da secreção gástrica, em ratos...	50
Figura 4.15: Efeito da administração i.p. do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a secreção gástrica, em ratos.....	51
Figura 4.16: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a atividade da H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ATPase gástrica isolada de coelhos.....	52
Figura 4.17: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a atividade da H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPase gástrica isolada de coelhos..	53
Figura 4.18: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o esvaziamento gástrico, em camundongos. ....	54
Figura 4.19: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o trânsito intestinal, em camundongos. ....	55
Figura 4.20: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o esvaziamento gástrico, em camundongos.....	56
Figura 4.21: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o trânsito intestinal, em camundongos .....	57
Figura 4.22: Efeito da administração do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o esvaziamento gástrico, em camundongos. ....	57
Figura 4.23: Efeito da administração do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o trânsito intestinal, em camundongos.....	58
Figura 4.24: Efeito da fração A do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a atividade da H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPase gástrica isolada de coelhos.....	59
Figura 4.25: Efeito das frações B (4.28 A), C (4.28 B), D (4.28 C) e E (4.28 D) do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a atividade da H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPase gástrica isolada de coelhos. ....	60

Figura 4.26: Efeito das frações B, C, D e E do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre a atividade da H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> - ATPase gástrica isolada de coelhos.....	61
Figura 4.27: Efeito antioxidante da fração A do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o DPPH, <i>in vitro</i> .....	62
Figura 4.28: Efeito antioxidante da fração B do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o DPPH, <i>in vitro</i> .....	62
Figura 4.29: Efeito antioxidante da fração C do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o DPPH, <i>in vitro</i> .....	62
Figura 4.30: Efeito antioxidante da fração D do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o DPPH, <i>in vitro</i> .....	63
Figura 4.31: Efeito antioxidante da fração E do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de <i>Arctium lappa</i> L. sobre o DPPH, <i>in vitro</i> .....	64



## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Efeitos dos extratos da Bardana sobre o trato gastrointestinal. ....	58
Tabela 5.1 – Percentual de efeito dos extratos das raízes da Bardana na atividade antioxidante. ....	68
Tabela 5.2 – Percentual de efeito dos extratos das raízes da Bardana na inibição da atividade da bomba de prótons. ....	70
Tabela 5.3 – Percentual de efeito dos extratos das raízes da Bardana na inibição da acidez do conteúdo gástrico. ....	71
Tabela 5.4 – Percentual de proteção dos extratos das raízes da Bardana nas lesões induzidas de forma aguda e crônica.....	72

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 – Classificação da <i>Arctium lappa</i> L. no reino vegetal, descrito por COSTA (1991).....	24
Quadro 1.2 - Hormônios gastrointestinais sua origem e funções. ....	31

## LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

5-HT – serotonina

Ach – acetilcolina

AINES – anti-inflamatório não esteroidal

AMPc – monofosfato de adenosine cíclico

ATC – ácido tricloroacético

ATP – trifosfato de adenosina

CAT – catalase

CB1 – receptor canabinóide tipo 1

CCK – colecistocinina

CCl<sub>4</sub> – tetracloreto de carbono

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX – enzima ciclooxigenase

COXIBs – inibidores seletivos da ciclooxigenase 2

DA - dopamina

DAG – diacilglicerol

DMSO – dimetil-sulfóxido

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

DTNB – ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EBC – extrato bruto clorofórmico das raízes da Bardana

EBE – extrato bruto etanólico das raízes da Bardana (UFPR)

ECL – células enterocromafins

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EET – extrato bruto etanólico das raízes da Bardana (UFSC)

EGTA – ácido bis(2-amino-etil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetracético

EP<sub>2</sub> – receptor de prostaglandina subtipo 2

FAS – Fundação de ação social

GIP – polipeptídeo inibidor gástrico

GLI – glicentin

GPx – glutaciona peroxidase

GR – glutathiona redutase  
GRP – peptídio liberador de gastrina  
GSH – glutathiona reduzida  
H<sub>2</sub> – receptor de histamina subtipo 2  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
HCl – ácido clorídrico  
HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – íon bicarbonato  
HDC – histidina descarboxilase  
HIV – vírus da imunodeficiência humana  
ID – intestino delgado  
id – via intraduodenal  
IL - interleucina  
ip – via intraperitoneal  
IP<sub>3</sub> – inositol 1,4,5 trifosfato  
KCl – cloreto de potássio  
LPS – lipopolissacarídeo de membrana bacteriana  
M<sub>1</sub> – receptor muscarínico subtipo 1  
M<sub>3</sub> – receptor muscarínico subtipo 3  
M<sub>5</sub> – receptor muscarínico subtipo 5  
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno  
MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio  
NaOH – hidróxido de sódio  
NK<sub>2</sub> – receptor de taquicinina subtipo 2  
NMDA – receptor ácido-N-metil-D-aspartico  
NO – óxido nítrico  
NOS – óxido nítrico sintase  
NOSc – óxido nítrico sintase constitutiva  
NOSi – óxido nítrico sintase induzida  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - ânion superóxido  
OH – hidroxila  
PACAP – peptídio ativador de adenilato ciclase pituitária

PAF – fator de agregação plaquetária

PG - prostaglandina

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E 2

PGI<sub>2</sub> – prostaciclina

Pi – fósforo inorgânico

ROS – espécies reativas de oxigênio

SNC – sistema nervosa central

SNE – sistema nervoso entérico

SOD – superóxido desmutase

SSTR1-5 – receptor de somatostatina subtipos de 1-5

TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná

TGF- $\alpha$  – fator de crescimento transformador alfa

TGI – trato gastrointestinal

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

VIP – polipeptídio intestinal vasoativo

VMAT-2 – transportador vesicular de monoamina subtipo 2

vo – via oral

VR<sub>1</sub> – receptor vanilóide

## RESUMO

A *Arctium lappa* L., uma planta da família Asteraceae (Compositae) (CUNHA *et al.*, 2003), é originária da Europa. Em estudos realizados no Departamento de Farmacologia da UFPR, CALIXTO *et al.* (2003) e MENDES *et al.* (2005), observaram os efeitos benéficos desta planta sobre o trato gastrointestinal. O objetivo deste trabalho foi dar continuidade aos estudos já realizados, avaliando os efeitos e os mecanismos de ação envolvidos na atividade protetora gástrica dos extratos brutos, e das frações do extrato mais ativo, obtidos das raízes da *Arctium lappa* L. (Bardana).

O efeito anti-secretor ácido exercido pelo extrato bruto etanólico (*in vivo*) obtido por MENDES *et al.* (2005) foi confirmado *in vitro* através da inibição da atividade da enzima  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase. Este resultado indica que a inibição da atividade da bomba de prótons está envolvida de forma significativa na redução da secreção ácida gástrica, participando do efeito gastroprotetor observado no modelo de lesão gástrica induzida pelo etanol.

No estudo da ação protetora gástrica do extrato bruto clorofórmico (EBC) e do extrato bruto etanólico (EET), utilizamos o modelo de lesão gástrica (em ratos) induzido de forma aguda (etanol) e crônica (ácido acético). O EET e o EBC foram eficazes em proteger a mucosa gástrica contra as lesões induzidas pelo etanol. O EET atingiu 50 % do seu efeito com a dose de 300 mg/kg e o EBC com a dose de 10 mg/kg. No modelo de lesão gástrica induzida de forma crônica (7 dias), ficou evidente o efeito cicatrizante de ambos os extratos EET e EBC.

A atividade antioxidante dos extratos foi confirmada através da técnica de mensuração da taxa de seqüestro do radical livre DPPH. O poder antioxidante do EET pôde ser observado já com a concentração de 50 µg/mL, com uma taxa de seqüestro de DPPH de 60 %, e o EBC reduziu esta taxa para 54 % com a concentração de 250 µg/mL.

Com os resultados obtidos na avaliação da atividade anti-secretora ácida *in vivo*, constatamos a presença do efeito do EET e do EBC em reduzir a secreção ácida gástrica, sendo que o EBC apresentou efeito mais potente quando

administrado pela via intraperitoneal. Nos estudos *in vitro*, através da inibição da bomba de prótons, comprovamos a presença do efeito inibidor do EET e do EBC sobre a enzima  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase.

Como o EET e o EBC não alteraram as taxas de esvaziamento gástrico e trânsito intestinal, sugerimos que o sistema colinérgico não tenha participação significativa nos mecanismos de ação destes extratos.

Os dois extratos apresentaram perfil de ação diferente, porém, como o efeito do EBC contra as lesões induzidas pelo etanol foi mais evidente, optamos por dar continuidade aos estudos com este extrato.

Das cinco frações obtidas do EBC, somente a fração A apresentou efeito equivalente ao do EBC no teste da inibição da atividade da  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase. Na avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das frações do EBC, somente a fração E apresentou efeito antioxidante sobre o DPPH.

Desta forma, concluímos que os dois extratos da Bardana (EET e EBC) são efetivos gastroprotetores, com diferenças de ações que indicam a presença e/ou concentração diferente de princípios ativos.

A soma dos resultados obtidos justifica a continuidade dos estudos com a Bardana, podendo assim apresentar uma maior utilidade para a população.

## ABSTRACT

The *Arctium lappa* L. (Burdock), a plant of Asteraceae family (CUNHA *et al.*, 2003), is originary from Europe. Recently, CALIXTO *et al.* (2003) and MENDES *et al.* (2005) described the beneficial effects of *A. lappa* on the gastrointestinal tract. The purpose of this work was to evaluate the effect on the possible gastric protective activity of crude extracts and fractions obtained from the roots of *A. lappa*. The anti-secretory effect of ethanolic extract observed by MENDES *et al.* (2005) was confirmed *in vitro*, with the inhibition of H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase activity. This result suggests that the inhibition of proton pump can be related to a decrease in gastric acid secretion, thus involved in gastroprotection that is observed in ethanol-injury model. In order to evaluate a gastroprotective activity of chloroformic extract (EBC) and ethanolic extract (EET), models of ethanol-induced acute gastric lesions and acetic acid-induced chronic gastric lesions were used. Both, EET and EBC were able to effectively protect animals from acute gastric lesions in both models, causing an inhibition of 50 % at doses of 300 mg/kg and 10 mg/kg, respectively. In acetic acid-induced chronic gastric lesions either EET or EBC were proficient to protect the stomach. The antioxidant property of *A. lappa* extracts was studied through the DPPH index. The EET scavenging ability was observed when DPPH index was reduced 60% at 50 µg/mL and for the EBC the index was reduced 54 % at 250 µg/mL. The results obtained for anti-secretory activity in the model of hypersecretion by pylorus ligation, showed a decrease in total acid secretion with both *A. lappa* extracts, where EBC presented the best effect when administered i.d.. In *in vitro* studies using proton pump, the inhibitor effect of EET and EBC was confirmed. Since both tested extracts, EET and EBC, did not modify the gastrointestinal motility, we suggest that the cholinergic way does not have an important participation in the gastroprotective mechanism of these *A. lappa* extracts.

However, both tested *A. lappa* extracts presented different gastroprotective profile, and since the EBC effect against ethanol-induced injuries was more evident, we decided to continue the study using EBC extract. Among all tested



EBC fractions, the fraction A was the one able to effectively inhibit  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase. The analysis of the antioxidant activity of EBC fractions, only the fraction E presented a scavenging effect of DPPH radical, whereas other fractions did not show any effect.

Thus, we can conclude that both *A. lappa* extracts (EET and EBC) are gastroprotectors, however acting through different mechanisms, indicating the presence and/or concentration of different actives compounds. Collectively, these results justify the continuity of studies with the Burdock, because this plant can be useful for the people.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas apresentam diversos compostos que podem apresentar efeitos sobre organismos animais. Esses efeitos, dependendo dos princípios ativos e/ou concentração destes produtos, podem ser úteis (na terapêutica) ou tóxicos. Os principais produtos ativos são oriundos, principalmente, do metabolismo secundário vegetal. As plantas medicinais se destacam como grandes fontes de novos recursos terapêuticos, e é a partir destas que a indústria farmacêutica desenvolve os medicamentos. Até o início do século XIX a maioria dos medicamentos utilizados pelo homem era basicamente de origem natural (BARROS, 2006). Um terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, e foi graças aos produtos naturais que os cientistas puderam compreender fenômenos complexos permitindo que enzimas, receptores, canais iônicos e outras estruturas biológicas fossem identificados, isolados e clonados (CALIXTO, 2003). As fórmulas sintéticas dominam o mercado da saúde, em decorrência do desenvolvimento da farmacologia (BARROS, 2006). Porém, uma das consequências desta evolução do setor farmacêutico, é a tendência do mercado de retornar aos medicamentos oriundos de produtos naturais. A indústria pode encontrar na natureza uma fonte inesgotável de novas estruturas químicas a serem descobertas e, como consequência, desenvolver novos medicamentos que serão possíveis alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças que ainda não apresentam cura ou tratamento adequado. A possibilidade de explorar o mercado de medicamentos de origem natural é bastante atrativa para a indústria, pois este é um dos setores que mais cresce, e representa cerca de 24 % do faturamento bruto das indústrias (CALIXTO, 2001).

Calcula-se que em alguns continentes como a África até 80% da população faz uso de medicamentos de origem vegetal. Na Alemanha e França são 75%, no Canadá 70% e nos EUA 42% (GREGÓRIO, 2006). Segundo DI STASI (1996), é necessário ressaltar que produto natural não é sinônimo de planta medicinal. As plantas medicinais são única e exclusivamente espécies vegetais, que apresentam

grande potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os produtos de origem natural que apresentam efeito farmacológico importante são notadamente provenientes das plantas superiores, das toxinas animais e dos microrganismos (DI STASI, 1996; CALIXTO, 2003). É fundamental qualificá-las de acordo com procedimentos como a identificação botânica, composição do solo, fatores ambientais (luz, umidade, temperatura) que influenciam o teor de princípios ativos presentes, época da colheita, transporte, secagem e armazenamento do produto. Na pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos a partir de plantas medicinais, deve-se considerar o emprego de estratégias que avaliem o tipo de estudo a ser realizado, a planta escolhida para o estudo (seu emprego pela medicina popular - levantamento etnofarmacológico), a preparação do extrato, os modelos experimentais a serem utilizados, a reprodutibilidade dos estudos, as doses e as concentrações a serem testadas. A seleção das espécies a serem estudadas também é de suma importância, visto que uma escolha inadequada da planta implica em desperdício de tempo e recursos (BRITO, 1996).

O Brasil poderia se sobressair no cenário mundial da produção de fitomedicamentos, por possuir a maior biodiversidade do mundo (cerca de 20% do número total de espécies do planeta). A importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos fica evidente quando se observa que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes naturais (25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais) (CALIXTO, 2003). Mais de 60% dos agentes quimioterápicos aprovados e 60-80% das novas drogas antibacterianas e anticâncer derivaram de produtos naturais (HARVEY, 1999; ROCHA *et al.*, 2001) e, entre as 520 novas drogas aprovadas nos anos de 1983 a 1994, 39% foram originadas de produtos naturais ou derivados destes (HARVEY, 1999).

A importância sócio-econômica deste segmento é confirmada quando se analisa os dados financeiros do setor. O mercado brasileiro de fitomedicamentos, que atingiu em 2001 cerca de US\$ 270 milhões, corresponde a 5.9 % do mercado nacional de medicamentos. Comparado com o custo da produção de um novo medicamento sintético, que envolve vultosas somas de recursos (cerca de US\$

350 milhões a US\$ 800 milhões e cerca de 10 a 15 anos de pesquisa), o desenvolvimento de um fitomedicamento requer menos recursos e também menor tempo de pesquisa (CALIXTO, 2003).

Entretanto, o nosso país não se destaca no aproveitamento de seus recursos naturais para a produção de fitoterápicos como poderia. Os principais fatores que justificam isto é a falta de investimentos em muitos dos segmentos da cadeia produtiva de plantas medicinais que levam a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos. Além dos grandes financiamentos para a utilização de alta tecnologia, faltam também as parcerias entre universidades, centros de pesquisa e as indústrias (CALIXTO, 2001; CORRÊA JÚNIOR e SCHEFFER, 2004).

Diversos são os fatores que contribuem negativamente, dificultando o registro de um medicamento a partir de plantas nativas. Dentre estes, destaca-se a realização pouco expressiva de pesquisas de plantas medicinais brasileiras voltadas para produção, a falta de informações quanto a segurança de uso, a eficácia terapêutica e a padronização de drogas vegetais. A não existência de um banco de dados sobre as espécies nativas é um fato adicional que dificulta o desenvolvimento do setor (FONTE, 2004).

A indústria de fitomedicamentos questiona o atual sistema de fiscalização, por este não obedecer a um padrão de exigências, não atuar de forma coordenada nas diferentes esferas da vigilância sanitária (estadual e municipal), e não exigir dos fornecedores de matéria prima o mesmo controle de qualidade que é exigido do produto industrializado (FONTE, 2004). Como resultado tem-se no Brasil, apesar da grande biodiversidade que possui, a utilização de plantas medicinais exóticas já estudadas em outros países, em detrimento das plantas nativas, que continuam necessitando de mais estudos (FONTE, 2004).

O Estado do Paraná se destaca no país por possuir a maior tradição no cultivo de plantas medicinais. A diversidade climática do Estado possibilita o desenvolvimento de uma maior diversidade de espécies nativas e também a introdução de espécies exóticas com grande facilidade. A produção de plantas medicinais no Estado é desenvolvida em 24 % dos municípios. A região de

Paranaguá é a que concentra maior número de produtores. Curitiba e Guarapuava possuem as maiores áreas cultivadas do Estado (CORRÊA JÚNIOR e SCHEFFER, 2004).

Um levantamento de dados realizado em 2004 por GUIMARÃES *et al.*, mostrou que a pesquisa com plantas medicinais realizada no Estado do Paraná, durante os anos de 1992 a 2002, abordou principalmente as ações biológicas (34%), sendo que o ramo predominante de investigação foi a atividade farmacológica (59,6 %). O extenso número de trabalhos visando à determinação das atividades gerais das plantas medicinais, comparado aos poucos trabalhos com estudos de mecanismo de ação, são um reflexo da limitação de infraestrutura existente, evidenciando a necessidade de maiores investimentos nesta área para um avanço científico efetivo.

Dentre as doenças mais freqüentes que levam a população a buscar atendimento nas unidades de saúde estão os distúrbios do trato gastrointestinal, que possuem tratamento complexo. A cooperação do paciente, respeitando os protocolos terapêuticos, é fundamental para a cura da doença. Como os fármacos comumente prescritos podem produzir efeitos adversos (como o hidróxido de alumínio e o sucralfato que podem causar constipação), acabam levando o paciente a abandonar o tratamento. Além disso, o fato de que os medicamentos indicados apresentam alto custo dificulta o seu uso pela população com baixa renda. Isto pode ser minimizado com a oferta de alternativas como as plantas medicinais. No estudo realizado por GRAÇA (2004), avaliando treze anos do uso de fitoterápicos em Curitiba, o autor concluiu que, apesar de não ter sido realizado um estudo sobre o grau de satisfação dos usuários de fitoterapia e/ou plantas medicinais, a aceitação foi boa, com relatos espontâneos de sucesso dos tratamentos fitoterápicos.

As informações sócio-econômicas, etnofarmacológicas e os resultados dos estudos realizados anteriormente nos estimularam a dar continuidade as pesquisas com a *Arctium lappa* L., conhecida popularmente como Bardana. O estudo se concentrou na avaliação da ação gastroprotetora do pó extraído das

raízes da Bardana sobre as lesões gástricas, os possíveis mecanismos de ação envolvidos no seu efeito e as frações isoladas responsáveis por estas ações.

## 1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.1 *Arctium lappa* L.

A *Arctium lappa* L. é uma planta da família Asteraceae (Compositae) (CUNHA *et al.*, 2003), originária da Europa e encontrada em países como Portugal, França e Itália. Também é muito comum no Japão, Taiwan (CHEN *et al.*, 2004) e China (WANG *et al.*, 2005).

Quadro 1.1 – Classificação da *Arctium lappa* L. no reino vegetal, descrito por COSTA (1991).

<b>DIVISÃO</b>	Magnoliophyta
<b>CLASSE</b>	Magnoliatae
<b>ORDEM</b>	Asterales
<b>FAMÍLIA</b>	Asteraceae
<b>GÊNERO</b>	Arctium
<b>ESPÉCIE</b>	<i>Arctium lappa</i> L.

Apresenta várias sinonímias nos vários países onde é encontrada. No Brasil é conhecida como Bardana, orelha de gigante, Bardana-maior; pegamasso, erva-dos-tinhosos (CUNHA *et al.*, 2003). No Japão é conhecida como gobo (KARDOSOVA *et al.*, 2003); lampazo é a sua denominação nos países de língua espanhola, bardane na França e burdock nos países de língua inglesa (CORRÊA, 1984; MORGAN, 1997).

A *Arctium lappa* L. é uma planta herbácea e bienal, de fácil cultivo, capaz de se desenvolver em ambientes úmidos e sombreados (Figura 1.1). Pode chegar até 1,5 m de altura (FONT QUER, 1988). De acordo com CASTRO (1981) e FONT QUER (1988), suas folhas caracterizam-se pelo tamanho (grandes), podendo

alcançar 40 cm de comprimento, além de apresentarem formato oval ou lanceolado (as superiores) e peciolado (Figura 1.2). As flores são rosadas ou púrpuras, e a floração ocorre no verão (CORRÊA, 1984), sendo que suas flores (e os frutos também) são formadas após o segundo ano do cultivo (MORGAN, 1997). Os frutos, aquênio oblongo-subtrígono, possuem papilos de pêlos muito caducos. As raízes podem chegar a 1,2 m de profundidade e 1 cm de diâmetro (Figura 1.2). São carnosas, fusiformes, brancas internamente e pardas externamente (FONT QUER, 1988). Preferencialmente, devem ser coletadas antes da floração (CORRÊA, 1984), pois as raízes maduras apresentam suas propriedades terapêuticas reduzidas com o passar do tempo (MORGAN, 1997).



Figura 1.1: *Arctium lappa* L.

(Fonte: <http://www.plantamed.com.br/FOTOS/Arctium-lappa2.jpg>; [www.boga.ruhr-uni-bochum.de/html/Arctium\\_lapp...](http://www.boga.ruhr-uni-bochum.de/html/Arctium_lapp...))



Figura 1.2: Raízes e folhas da *Arctium lappa* L.

(Fonte: [www.fast.org.tw/r06/new\\_page\\_16.htm](http://www.fast.org.tw/r06/new_page_16.htm); <http://www.plantamed.com.br/FOTOS/Arctium-lappa2.jpg>)

Dentre as outras espécies do gênero *Arctium*, COSTA (1991) e CORRÊA (1984) citam a *Arctium nemorosum*, *Arctium leospermum*, *Arctium tomentosum* e *Arctium minus* Bernhadi, esta última podendo ser encontrada no Brasil. A *Arctium minus* B. (Figura 1.3) é também conhecida como Bardana menor. A diferença entre a Bardana menor e a maior, além do tamanho, é a inflorescência. Na *Arctium minus* B. é em racimo (que a prende em um cacho, onde se inserem as flores), e na *Arctium lappa* L. é em corimbo (as flores estão num mesmo nível na porção superior, apesar de surgirem de alturas diferentes).



Figura 1.3: *Arctium minus* B.

(Fonte: [www.amg.gda.pl/~orl/FOTO-GALERIA/ASTERACEAE.htm](http://www.amg.gda.pl/~orl/FOTO-GALERIA/ASTERACEAE.htm))



Quanto a composição química das raízes da *A. lappa*, ela contém inulina (45-60%), mucilagens, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos (ácido caféico e derivados, ácido clorogênico e isoclorogênico), óleo essencial, poliacetilenos (ácido arético, arctinona, arctinol, arctinal), taninos (CUNHA *et al.*, 2003), flavonóides (baicalina) (UCHIYAMA *et al.*, 2005) e lignanas (arctigenina) (CHO *et al.*, 2004).

As indicações populares da Bardana são amplas. É utilizada por suas propriedades diuréticas e antipiréticas (CHEN *et al.*, 2004). Também existem relatos de ações da Bardana como depurativa, diaforética (MORGAN, 1997), desmutagênica (MORITA *et al.*, 1984), digestiva e em doenças dermatológicas, como psoríase (CUNHA *et al.*, 2003). A toxicidade da Bardana não é totalmente conhecida, porém pode potencialmente causar sensibilização cutânea por contato (RODRIGUEZ *et al.*, 1995; CUNHA *et al.*, 2003). No ano de 2003, SASAKI *et al.* relataram um caso de anafilaxia como conseqüência da ingestão de Bardana. O consumo da Bardana também não é recomendado durante a gestação, devido a presença de uma atividade estimulante uterina (CUNHA *et al.*, 2003).

Estudos comprovaram o efeito da arctigenina atenuando a proliferação de linfócitos B e T, e também a produção de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) estimulada pelo LPS (lipopolissacarídeos) em macrófagos (CHO *et al.*, 1999). Este composto também apresenta ação inibitória sobre a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (EICH, E. *et al.*, 1996; VLIETINCK *et al.*, 1998; CHO *et al.*, 2004). Este efeito anti-HIV, também observado por SCHRODER *et al.* (1990), foi caracterizado pela redução da expressão de proteínas do HIV (p17 e p24) e redução da atividade da transcriptase reversa em 80-90 %. A baicalina, presente na *A. lappa*, também atua como anti-HIV (LI *et al.*, 1993; KITAMURA *et al.*, 1998), principalmente quando associada ao zinco, diminuindo a atividade recombinante da transcriptase reversa e a entrada do HIV nas células hospedeiras (WANG *et al.*, 2004).

A arctiina, um glicosídeo da arctigenina, está presente nas sementes da Bardana. Foi sugerida a possibilidade de este composto ser indutor de câncer de

próstata, em decorrência de sua transformação pelas bactérias intestinais a substâncias estrogênicas e antiestrogênicas e pela indução de enzimas responsáveis pelo metabolismo de drogas. Porém, os resultados obtidos por ZENG *et al.* (2005), não confirmaram esta suspeita. Ainda contrariando este suposto efeito carcinogênico, o seu efeito anti-cancerígeno foi confirmado pelo teste de indução de tumores cutâneos induzidos pelo 7, 2 di-metil-benzatraceno, em ratos (WANG *et al.*, 2005).

UCHIYAMA *et al.* (2005) citam que a baicalina, presente na Bardana, seria um composto que apresenta atividades antipirética e antiinflamatória. Esta última, também é citada por LIN *et al* (1996) como uma das propriedades da Bardana, observada através da redução do edema de pata por carragenina, em ratos.

A atividade antibacteriana da *A. lappa* foi confirmada por PEREIRA *et al*, (2005), utilizando a fração hexânica das folhas, e por GENTIL *et al* (2006), com a fração acetato de etila em infecções intracanal dentário, em cães.

O efeito de um polissacarídeo tipo inulina, presente nas raízes da Bardana, caracterizou-se como supressor da tosse. Esta ação foi equivalente a alguns medicamentos não narcóticos usados na prática clínica para tratar a tosse. Também apresentou significativa resposta nos testes de atividade mitogênica e comitogênica, comparável ao do Zymosan (imunomodulador), o que confirma a atividade imunológica das partículas de inulina sugeridas em relatos prévios (KARDOŠOVÁ *et al.*, 2003).

A Bardana também apresenta muitos relatos sobre a sua atividade antioxidante. Estudos *in vitro* demonstraram que a ação antioxidante da Bardana era resultado da redução das espécies reativas ao oxigênio (ROS) e dos danos ao DNA celular (LEONARD *et al*, 2006). Esta ação antioxidante foi considerada como o mecanismo responsável pela hepatoproteção observada após a hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno e pelo tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) (LIN *et al*, 2000), e após a hepatotoxicidade induzida pelo etanol e potencializada pelo CCl<sub>4</sub> (LIN *et al*, 2002).

Em 2003, no departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), SBOLLI constatou que o extrato bruto etanólico, obtido das raízes

da Bardana e da fração clorofórmica deste extrato, promoveram efeitos depressores sobre sistema nervoso central, provavelmente envolvendo o sistema gabaérgico.

Nos estudos sobre as atividades dos extratos brutos da Bardana sobre o trato gastrointestinal, realizados de 2003 até 2005 na UFPR, foram observados efeitos gastroprotetores. O extrato bruto aquoso, extraído das folhas da Bardana, foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra lesões agudas induzidas pelo etanol. Esta atividade anti-ulcerogênica seria consequência da manutenção de fatores protetores da mucosa gástrica, como a enzima GSH e a camada de muco gástrico (CALIXTO *et al.*, 2003). O extrato bruto etanólico (EBE), extraído das raízes, protegeu a mucosa gástrica contra lesões agudas induzidas pelo etanol pelas vias oral e intraperitoneal. Neste modelo, o EBE manteve os níveis de muco gástrico, justificando assim a citoproteção observada. Também foi efetivo protegendo a mucosa gástrica contra as lesões agudas induzidas pelo estresse e reduzindo o volume e a acidez da secreção gástrica no modelo de ligadura do piloro (MENDES *et al.*, 2005), além de reduzir a atividade da bomba de prótons foi reduzida em 32 % na concentração de 1000 µg/mL.

Com base nestes resultados, o intuito deste trabalho foi dar continuidade aos estudos iniciados em 2005, prosseguindo na avaliação dos extratos obtidos do pó das raízes da Bardana sobre o trato gastrointestinal.

### **1.1.2 Fisiologia gástrica**

O trato gastrointestinal (TGI) é um dos sistemas do organismo de importância fundamental, considerando sua função de prover o mesmo de água, eletrólitos e alimentos (GUYTON e HALL, 2006). As suas funções dependem de propriedades inerentes à musculatura lisa intestinal, reflexos de neurônios intrínsecos no intestino e no sistema nervoso central (SNC), efeitos parácrinos de mediadores químicos e hormônios gastrointestinais (GANOG, 2003). Porém, a maioria de suas funções é autônoma e controlada predominantemente pelo sistema nervoso entérico (SNE) (HOOGERWERF e PASRICHA, 2001).

O SNE está presente na parede do TGI, do esôfago até o ânus, e é formado por aproximadamente 100 milhões de neurônios, o equivalente ao total de neurônios presentes na medula espinhal. Está envolvido no controle da motilidade e secreção do TGI. É composto basicamente por dois plexos: (1) plexo mioentérico (Auerbach): localizado entre a camada muscular longitudinal e circular da parede intestinal, e responsável pelo controle motor; (2) plexo submucoso (Meissner): localizado na submucosa da parede intestinal, e regula a secreção, transporte de líquidos e o fluxo vascular. Fibras extrínsecas do simpático e parassimpático são responsáveis pela conexão entre estes plexos (GUYTON e HALL, 2006).

Vários neurotransmissores estão envolvidos nas múltiplas ações do SNE, sendo que a acetilcolina e a noradrenalina são os mais conhecidos. O primeiro atua através de estímulos excitatórios no SNE e o segundo geralmente é inibitório. Dentre os outros neurotransmissores atuantes neste sistema, onde muitos destes não têm suas funções totalmente definidas, temos a serotonina (5-HT), dopamina (DA), colecistocinina (CCK), adenosina trifosfato (ATP), substância P, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), leu-encefalina, met-encefalina, somatostatina e bombesina (GUYTON e HALL, 2006).

Além do controle neural, realizado pelo SNE, as funções gastrointestinais também são reguladas pelos hormônios gastrointestinais. Estes são secretados principalmente pelas células endócrinas dispersas no epitélio do estômago e intestino delgado. Na superfície destas células, as quais estão expostas ao lúmen gastrointestinal, várias substâncias presentes no quimo as estimulam a liberarem os hormônios. Embora alguns destes hormônios sejam liberados no lúmen do TGI, e atuem localmente como agentes parácrinos, a maioria atua via corrente sanguínea (VANDER *et al.*, 2001). Os hormônios gastrointestinais podem ser enquadrados, de acordo com a similaridade estrutural e funcional, dentro de uma das duas famílias hormonais: a família gastrina (gastrina e CCK) e a família secretina (glucagon, glicentin - GLI, VIP e polipeptídeo inibidor gástrico - GIP). Existem ainda outras substâncias citadas como hormônios gastrointestinais e que

não se enquadram em nenhuma das duas famílias (por exemplo, motilina, bombesina, somatostatina, glucagon, etc) (GANOG, 2003).

Quadro 1.2 - Hormônios gastrointestinais sua origem e funções.

Hormônios	Origem	Localização	Funções
<b>Gastrina</b>	Células G	antro	Aumenta secreção ácida gástrica e motilidade gástrica e intestinal
<b>CCK</b>	Células I	Cérebro; íleo distal e cólon	Ingestão alimentar; secreção de suco pancreático, inibe esvaziamento gástrico e melhora motilidade intestinal
<b>Secretina</b>	Células S	Porção superior do ID	Aumenta secreção de $\text{HCO}_3^-$ , diminui secreção ácida gástrica e promove contração do piloro
<b>GIP<sup>1</sup></b>	Células K	Duodeno e jejuno	Inibe secreção gástrica e motilidade, em altas doses; em doses pequenas apresenta efeito pouco significativo
<b>VIP</b>	Neurônios	TGI e cérebro	Relaxamento dos esfíncters do TGI, vasodilatação periférica e inibição da secreção ácida gástrica
<b>Motilina</b>	Células ECL e Mo	Estômago, ID e cólon	Contração da musculatura lisa do estômago e intestino
<b>Glucagon</b>	Células A	TGI superior	Hiperglicemiante
<b>Neurotensina</b>	Neurônios e células da mucosa	íleo	Inibe motilidade e aumenta fluxo sanguíneo
<b>Substância P</b>	Neurônios e células endócrinas	TGI	Aumenta motilidade do intestino delgado
<b>Somatostatina</b>	Células D	Mucosa do TGI e pâncreas	Inibe secreção ácida gástrica e motilidade, inibe secreção pancreática exócrina, contrai vesícula biliar e

			promove absorção de glicose aminoácidos e triglicerídeos
<b>Grelina</b>	-	Estômago	Controle da ingestão alimentar e secreção de hormônios do crescimento
<b>Guanilina</b>	Células mucosas	TGI	Aumenta secreção de Cl <sup>-</sup> no lúmen intestinal

<sup>1</sup> Nota: Também conhecido como peptídio insulínico dependente de glicose.  
FONTE: (GANOG, 2003).

#### 1.1.2.1 Anatomo-fisiologia

O estômago é um órgão muscular oco, grande, em forma de feijão e é dividido em três partes: o cárdia, o corpo (fundo) e o antro (MANUAL MERCK, 2006). É delimitado do esôfago pelo esfíncter gastro-esofágico e do duodeno pelo esfíncter pilórico ou piloro. A mucosa gástrica contém muitas glândulas profundas. Na região próxima ao cárdia e ao piloro existem as glândulas secretoras de muco (GANOG, 2003). Na região do corpo e fundo (mucosa oxíntica) existem as glândulas gástricas e na região antral (mucosa pilórica) existem as glândulas pilóricas (CONTRAN *et al.*, 1996). As glândulas gástricas são formadas pelas células parietais, produtoras de ácido clorídrico (HCl) e fator intrínseco; pelas células mucosas, produtoras de muco; pelas células principais, produtoras de pepsinogênio; e pelas células D produtoras do maior inibidor parácrino da secreção ácida, a somatostatina (RANG *et al.*, 2003). As glândulas pilóricas são formadas pelas células G, produtoras de gastrina; pelas células enterocromafins (ECL), produtoras de histamina; além dos demais tipos celulares presentes nas glândulas gástricas, com exceção das células parietais (RANG *et al.*, 2003; GUYTON e HALL, 2006).

A regulação da secreção ácida gástrica é um processo complexo, que envolve muitos tipos celulares, hormônios e mediadores, os quais convergem para a etapa final da secreção que é a atividade da H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase (HORN, 2000). O produto final desta cadeia, o ácido gástrico, é responsável pela digestão de proteínas, absorção de ferro, cálcio e vitamina B<sub>12</sub>, além de prevenir o crescimento

bacteriano no estômago e a infecção entérica. Neste processo, destacam-se as células parietais, as células ECL, as células G e as células D (Revisado por SCHUBERT, 2004). Estas células são reguladas por mecanismos centrais, periféricos e intracelulares.

❖ **Mecanismos centrais - estimulantes:**

O núcleo motor dorsal do vago na medula e o núcleo paraventricular no hipotálamo atuam na integração da informação aferente e eferente. Existem vários neurotransmissores e neuropeptídeos no SNC responsáveis pela regulação da secreção ácida gástrica (Revisado por HOU e SCHUBERT, 2006).

O estímulo vagal central pelo frio ou pela administração do hormônio liberador de tireotropina ativam neurônios colinérgicos no estômago, os quais aumentam a secreção ácida pelas células parietais. Esse estímulo via nervo vago também ocorre pela ação de canabinóides endógenos, como a anandamida (Revisado por HOU e SCHUBERT, 2006). ADAMI *et al.* (2002) observaram que o efeito anti-secretor gástrico dos canabinóides é mediado pela supressão da condução vagal para o estômago, através dos receptores CB<sub>1</sub> localizados nas vias colinérgicas pré e pós ganglionares.

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório no SNC dos mamíferos, ativando seus receptores NMDA e cainato, após administração intra cérebro ventricular, estimulou a secreção ácida gástrica. Estes efeitos foram bloqueados pela vagotomia, sugerindo que o glutamato, atuando via vagal, estaria envolvido na regulação central da secreção ácida gástrica (Revisado por SCHUBERT, 2002).

A capsaicina, uma substância encontrada na pimenta, atua através dos receptores vanilóides (TRPV<sub>1</sub>), ativando neurônios sensoriais. Em ratos anestesiados, a capsaicina administrada centralmente promoveu um estímulo da secreção ácida do estômago. Seu efeito estaria envolvido com a ativação dos receptores TRPV<sub>1</sub> e com a liberação de taquicinas e de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), visto que a eliminação deste efeito foi observada com vagotomia, administração de capsazepina, um antagonista TRPV<sub>1</sub> (Revisado por

SCHUBERT, 2004), antagonistas NK2 de taquicininas e antagonistas de receptores CGRP (MINOWA *et al.*, 2004).

❖ **Mecanismos centrais - inibidores:**

A bombesina tem sua ação anti-secretora observada ao abolir a secreção gástrica estimulada por pentagastrina em ratos. Este efeito foi eliminado após transecção do cordão espinhal cervical (Revisado por SCHUBERT, 2002).

❖ **Mecanismos periféricos - estimulantes:**

Uma variedade de peptídios presentes no estômago, como a gastrina, GRP, orexina, grelina, peptídio natriurético atrial, leptina, o óxido nítrico, assim como a ingestão de alimentos, regulam a secreção ácida gástrica (Revisado por HOU e SCHUBERT, 2006).

A gastrina e a CCK apresentam a mesma seqüência de peptídeos no seu terminal carboxil. Existem duas classes de receptores gastrina/CCK caracterizados: CCK-1 (antigo CCK-A), com maior especificidade para a CCK; e o CCK-2 (antigo CCK-B), com maior especificidade para a gastrina. Ambos são receptores acoplados a proteína G, sendo que o CCK-1 atua via fosfolipase A<sub>2</sub> e o CCK-2 ativa fosfolipase C, atuando via inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Revisado por SCHUBERT, 2004).

A gastrina estimula a secreção ácida do estômago diretamente, ao ocupar os receptores CCK-2 presentes na membrana das células parietais, e indiretamente, através da liberação de histamina pelas células ECL (FRIIS-HANSEN, 2006). Estudos em camundongos nocaute para gastrina e para receptores CCK-2 apresentaram reduzido número de células ECL, aumento do muco e de células epiteliais superficiais. Estes animais ainda manifestaram hipocloridria e redução do número de células parietais, além de menor responsividade a secretagogos (Revisado por HOU e SCHUBERT, 2006) e aumento do número de bactérias no estômago (FRIIS-HANSEN, 2006). Assim, a gastrina, via receptor CCK-2, é essencial para a maturação funcional do sistema



secretor ácido e para diferenciação das células da mucosa gástrica, dentre elas as células parietais e as ECL (Revisado por SCHUBERT, 2004).

A acetilcolina, liberada pelos neurônios pós-ganglionares do SNE, estimula a secreção ácida ao ativar diretamente os receptores  $M_3$  das células parietais. Também podem atuar através da regulação da ativação das células ECL, via liberação de gastrina pelas células G e/ou pela liberação de neuropeptídeos. Dentre os cinco receptores muscarínicos da acetilcolina (Ach), os receptores  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  atuam acoplados a proteína  $G_{q/11}$ , ativando a fosfolipase C e produzindo  $IP_3$  e diacilglicerol (DAG), seguido pelo aumento dos níveis intracelulares de cálcio (AIHARA *et al.*, 2005). Trabalhos realizados com camundongos nocaute para o receptor  $M_3$  demonstraram uma redução da secreção ácida, menor proporção de células parietais funcionais e altos níveis de gastrina no soro (AIHARA *et al.*, 2003; Revisado por SCHUBERT, 2004). O receptor muscarínico  $M_5$  também pode estar envolvido na ativação colinérgica da secreção ácida, ao estimular a liberação de histamina pelas células ECL. Este processo pode ser mediado pela liberação de neuropeptídeos, como o peptídeo ativador da adenilato ciclase da pituitária (PACAP), pelas fibras nervosas entéricas pós ganglionares. Já o receptor muscarínico  $M_1$  parece não estar envolvido na regulação da secreção ácida gástrica em camundongos, apesar de relatos do uso de antagonistas  $M_1$ , como pirenzepina e telenzepina, evidenciarem uma inibição da secreção ácida. AIHARA *et al.* (2005), utilizando camundongos Nocaute para  $M_1$ , observaram que a pirenzepina promoveu uma redução da secreção ácida gástrica estimulada com carbacol, sugerindo que o efeito inibitório da pirenzepina é independente do antagonismo do receptor  $M_1$ .

A produção de histamina pelas células ECL é resultado da descarboxilação enzimática da histidina, através da enzima histidina descarboxilase (HDC). A histamina produzida é estocada em vesículas e liberada em resposta ao estímulo da gastrina, fator de crescimento transformador  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), VIP e PACAP (Revisado por HOU e SCHUBERT, 2006). A histamina é secretada no citosol e captada por grânulos e vesículas secretoras e estocada através de transportadores vesiculares de monoamina subtipo 2 (VMAT-2) (ZHAO, *et al.*,

2003) e também via ATPase tipo V. A ativação dos receptores CCK-2 das células ECL pela gastrina resulta numa resposta bifásica do cálcio, a qual é crucial para a secreção de histamina e para a proliferação deste tipo celular (PRINZ *et al.*, 2003). Esta resposta pode advir do aumento da expressão/ativação da histidina descarboxilase, que provavelmente resulta do aumento da transcrição do RNAm da HDC, modificação pós translacional da enzima e supressão da taxa de degradação da enzima (ZHAO, *et al.*, 2003). Este estímulo sobre a transcrição e a atividade da HDC também é feito pelo PACAP e TGF- $\alpha$  (Revisado por SCHUBERT, 2004). O estímulo promovido pela histamina sobre a célula parietal ocorre em resposta a ativação do receptor H<sub>2</sub>, o qual atua via ativação da adenilato ciclase e conseqüente aumento dos níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) . O fato dos antagonistas de receptores H<sub>2</sub> inibirem, não somente a secreção ácida gástrica estimulada pela histamina, como também, a resposta secretora ácida induzida pela Ach e gastrina, sugere um papel majoritário da histamina na estimulação periférica da secreção ácida gástrica (OCHI *et. al.*, 2005).

#### ❖ Mecanismos periféricos - inibidores:

A somatostatina, produzida pelas células D do fundo e antro gástrico, inibe a secreção ácida gástrica. Esta inibição pode ocorrer por um efeito direto sobre a célula parietal, através da inibição da liberação de histamina pelas células ECL (KOMASA *et al.*, 2002) e também pela inibição da liberação de gastrina pelas células G (Revisado por SCHUBERT, 2004).

A produção de somatostatina pode ser estimulada pela adrenomedulina, um peptídeo encontrado nas células ECL e células principais do fundo gástrico, o qual pode então atuar como uma substância favorecedora dos mecanismos de defesa e reparo da mucosa gástrica (HIRSCH *et al.*, 2003).

As ações da somatostatina são mediadas por cinco subtipos de receptores acoplados a proteína G, denominados SSTR1 a SSTR5. Estudos com camundongos nocaute para o subtipo SSTR2 sugerem que este é o subtipo principal na regulação da secreção ácida gástrica. Apesar da secreção ácida

nestes animais ser dez vezes maior que a de animais selvagens, os níveis de gastrina na circulação se mantiveram normais, sugerindo que este subtipo de receptor não está envolvido na supressão da produção de gastrina pelas células G. Os receptores SSTR2 foram recentemente identificados nas células parietais e nas células ECL (Revisado por SCHUBERT, 2004). O estudo de KOMASA *et al.* (2002) sugere que a inibição da liberação de histamina pelas células ECL é a via principal de inibição da secreção gástrica pela somatostatina.

Outros inibidores da secreção ácida gástrica são leptina, peptídio natriurético atrial e óxido nítrico (NO). Dentre estes se destaca o NO, um gás sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, por meio da enzima óxido nítrico sintase (NOS). A NOS endotelial tem sido encontrada nas células ECL e a NOS neuronal nas células parietais. Porém, os seus efeitos sobre a secreção ácida gástrica são controversos, pois há relatos de efeitos estimulantes e de efeitos inibitórios (Revisado por HOU e SCHUBERT, 2006).

#### ❖ Mecanismos intracelulares:

A ação da  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase, localizada na membrana apical da célula parietal, é bombear  $H^+$  contra um gradiente de concentração. A célula parietal tem a membrana apical revestindo o lúmen das glândulas gástricas e a membrana basolateral em contato com o fluido intersticial. Os canalículos se estendem desde a membrana apical para dentro da célula. As células contêm também estruturas túbulo-vesiculares com moléculas da  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase nas paredes (GANOG, 2003).

Quando as células parietais são estimuladas, as estruturas túbulo-vesiculares se direcionam a membrana apical e se fusionam com ela, inserindo muitas moléculas de  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase na membrana. A  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase promove a secreção do  $H^+$  no lúmen gástrico, trocando-o por  $K^+$ . O  $Cl^-$  também é expelido através de seus canais ativados por AMPc. O  $HCO_3^-$ , formado pela dissociação do  $H_2CO_3$  é expelido por antiporte na membrana basolateral das células parietais que trocam o  $HCO_3^-$  por outro ânion, principalmente  $Cl^-$  (GANOG, 2003).

A secreção ácida pela célula parietal envolve a elevação dos níveis intracelulares de cálcio e AMPc, seguido pela translocação da bomba de prótons

(H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase) das túbulo vesículas citoplasmáticas para a membrana apical da célula parietal (Revisado por HOU e SCHUBERT, 2006). Os receptores H<sub>2</sub> de histamina aumentam AMPc, via proteína Gs. Os receptores CCK-2 de gastrina e os receptores colinérgicos M<sub>3</sub> aumentam os níveis intracelulares de cálcio. A interação destes eventos intracelulares é tanta que a ativação de um tipo de receptor potencializa a resposta de outro para a estimulação. As prostaglandinas (PG), principalmente PGE<sub>2</sub>, inibe a secreção ácida, pela ativação dos receptores EP<sub>3</sub>, via ativação da proteína Gi (HOOGERWERF e PASRICHA, 2001; GANOG, 2003).

#### 1.1.2.2 Úlcera gástrica

##### 1.1.2.2a Etiopatogenia

Existem relatos comprovando que a humanidade tem convivido com úlcera gástrica desde o século IV antes de Cristo. Para o tratamento destes distúrbios era recomendada, há mais de doze séculos, a neutralização ácida. Desta época até os dias atuais houve grandes avanços na terapêutica e no entendimento da patogênese, advindo assim o conhecimento a respeito dos inibidores da bomba de prótons e do *Helicobacter pylori* (HOOGERWERF e PASRICHA, 2001).

A úlcera gástrica pode ser definida como solução de continuidade na mucosa do trato digestivo, que se estende através da camada muscular da mucosa até a submucosa, ou ainda mais profundamente (CONTRAN *et al.*, 1996).

As úlceras ocorrem mais freqüentemente no duodeno, onde mais de 95% ocorrem na sua primeira porção, e 90% estão localizadas próximo da junção do piloro com a mucosa duodenal. No estômago, as úlceras se localizam mais comumente no antro (60%) e na junção do antro com o corpo, na pequena curvatura (25%). A incidência de úlceras gástricas parece ser ligeiramente maior em homens em relação às mulheres (1,3: 1), sendo que a faixa etária de maior

ocorrência das úlceras duodenais é de 30-55 anos, e das úlceras gástricas é de 50-70 anos (ABITOL, 2005).

Na úlcera gástrica, as lesões ocorrem pela ação do HCl sobre a mucosa (CHAPADEIRO *et al.*, 1987; VANDER *et al.*, 2001), como resultado de um desequilíbrio entre os fatores agressores e os mecanismos de defesa da mucosa gástrica (HOLZER, 2000; NATALE *et al.*, 2004). Teoricamente, este desequilíbrio ocorre em 3 condições: com a redução dos mecanismos de defesa, com o aumento dos fatores agressores ou a associação de ambos (CHAPADEIRO *et al.*, 1987). O HCl é considerado o maior fator agressor da mucosa gastro-duodenal desde 1910, pelo médico alemão K. Schwartz, o qual considerou que a presença do HCl é condição *sin qua non* pra formação da úlcera (Revisado por KONTURECK *et al.*, 2004). O HCl, assim como a pepsina, atuam quebrando a proteção da barreira mucosa e agravam as lesões (MAITY *et al.*, 2003).

Dentre os principais mecanismos protetores da mucosa gástrica tem-se a barreira muco/bicarbonato, a barreira epitelial, o fluxo sangüíneo, as enzimas antioxidantes, as prostaglandinas e o NO. Os mecanismos agressores da mucosa gástrica, que contribuem para a ulcerogênese, compreendem agentes químicos, que podem ser endógenos (HCl, pepsina) e agentes químicos exógenos (etanol, anti-inflamatórios não esteroidais - AINES), e agentes biológicos (*Helicobacter pylori*).

#### ❖ Fatores protetores da mucosa gástrica

##### ✓ Muco/bicarbonato

O muco, secretado pelas células mucosas do estômago, atuam como a primeira linha de defesa da mucosa gástrica e a protege de fatores agressores endógenos e exógenos. O muco também tem um papel importante na cicatrização das úlceras, acelerando a recuperação da mucosa lesada (MAITY *et al.*, 2003). Estudos em ratos observaram uma relação inversa na espessura da camada de muco e na acidificação intracelular do epitélio gástrico (PHILLIPSON *et al.*, 2002).

A camada de muco, que recobre a parede gástrica luminal, pode ser dividida em duas: uma mais superficial, frouxamente aderida, podendo ser facilmente removida; e outra mais interna, firmemente aderida à mucosa gástrica. As propriedades físicas e importância fisiológica das diferentes camadas de muco são desconhecidas, assim como sua composição e possíveis diferenças na sua permeabilidade ao ácido gástrico (PHILLIPSON *et al.*, 2002).

A infecção por *H. pylori* e o uso de AINES inibem a síntese e secreção de mucina e há queda da densidade/espessura da camada de muco. Por isso, em muitos estudos, a densidade da camada de muco está sendo correlacionada com a proteção da mucosa (PHILLIPSON *et al.*, 2002).

A produção de bicarbonato pelas células epiteliais superficiais é estimulada pelas PG endógenas (PHILLIPSON *et al.*, 2002), NO e neurônio aferentes sensíveis a capsaicina, e regulada pelo ácido luminal (KAGAWA *et al.*, 2003). Para cada próton secretado pela célula parietal, um íon bicarbonato é liberado de sua membrana basolateral por capilaridade, até a superfície do epitélio gástrico. Este transporte de  $\text{HCO}_3^-$  durante a secreção ácida é provavelmente importante para a manutenção de um pH neutro na superfície epitelial, enquanto que o pH luminal é baixo (PHILLIPSON *et al.*, 2002).

No estômago a mucosa gástrica é coberta por células epiteliais justapostas, contínuas a camada de muco, para o qual o  $\text{HCO}_3^-$  é secretado criando um gradiente de pH através do muco, que neutraliza qualquer difusão de  $\text{H}^+$  do lúmen gástrico em direção às células epiteliais superficiais e assim prevenindo a sua acidificação e danos. Como o  $\text{HCO}_3^-$  é secretado na camada de muco, sua secreção é altamente efetiva na neutralização do  $\text{H}^+$  luminal (Revisado por KONTUREK *et al.*, 2004).

#### ✓ **Fluxo sangüíneo**

O suprimento de sangue oxigenado para a mucosa gástrica é um fator importante, determinante para a integridade da mucosa gástrica. A elevação do fluxo sangüíneo é importante para a proteção da mucosa gástrica, quando a barreira protetora mucosa do estômago é rompida e ocorre retrodifusão de  $\text{H}^+$

para as células da mucosa (MAITY *et al.*, 2003). Todos os mecanismos de defesa e reparo dependem de um suporte eficiente de fluxo sangüíneo. Situações de isquemia comprometem a proteção da mucosa gastrointestinal e pode levar a proliferação bacteriana e doenças sistêmicas (Revisado por HOLZER, 2000).

Lesões na mucosa do TGI são frequentemente associados com distúrbios na microcirculação. Danos promovidos pelo etanol envolvem a degranulação de mastócitos, que liberam mediadores com ações adversas variadas. A degranulação de mastócitos e a liberação de fator ativador de plaquetas (PAF) são também responsáveis pelo efeito do *H. pylori* em reduzir o fluxo sangüíneo da mucosa gástrica, em ratos (Revisado por HOLZER, 2000).

Os distúrbios microcirculatorios que acompanham os danos na mucosa podem estar relacionados a um desequilíbrio nos mensageiros endoteliais vasculares, como a endotelina-1, NO, e prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ). Enquanto a produção fisiológica de NO pela NOSc é benéfica, a produção exagerada de NO pela NOSi agrava os distúrbios vasculares e da mucosa observados nos estômagos de ratos estressados, endotoxêmicos e diabéticos. O mediador endotelial  $\text{PGI}_2$  é liberado durante o estresse de imersão na água e contraria a vasoconstrição induzida pelo estresse, aumentando a permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos. A  $\text{PGE}_2$  dilata ambas, arteríolas e vênulas, na submucosa gástrica de ratos, via ação do receptor  $\text{EP}_2$ , enquanto que a constrição venular é feita pelos receptores  $\text{EP}_3$  (Revisado por HOLZER, 2000).

A potente ação vasoconstritora da endotelina tem probabilidade de estar envolvida na patogênese de várias condições caracterizadas pelo espasmo vascular. A infusão de endotelina-1, na artéria gástrica ou na submucosa gástrica, induz erosões na mucosa de ratos, enquanto que a infusão intravenosa aumenta os danos induzidos pela instilação intra-gástrica de etanol ou ácido. Existem relatos de que as lesões na mucosa gástrica induzidas pela endotelina-1 são suprimidas pela prostaciclina ou antagonistas do PAF, indicando que, junto com as propriedades vasoconstritoras, vários outros fatores estão envolvidos no mecanismo de lesão da mucosa (Revisado por KURTEL e GHANDOUR, 1999).

### ✓ NO

O NO é um importante transmissor endógeno, produzido pela ação da NO sintase induzida (NOSi) ou constitutiva (NOSc), e ambas as enzimas tem sido detectadas na mucosa gástrica de ratos (NATALE *et al.*, 2004). A ação da NOSc é dependente de cálcio e a da NOSi é independente de cálcio (BAYIR *et al.*, 2006). A NOSc compreende a NOS endotelial e a NOS neuronal. Elas são expressas em condições fisiológicas, enquanto que a NOSi não existe em condições normais, sendo induzida por certas citocinas, como lipopolissacarídeos (LPS) ou fator de necrose tumoral -  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) (NISHIO *et al.*, 2006).

É evidenciado na literatura o efeito protetor ou prejudicial do NO na patofisiologia da gastroproteção (NATALE *et al.*, 2004). Embora a produção de NO pela NOSc seja importante na manutenção da integridade da mucosa, recentes estudos demonstram que o NO atua de maneira bifásica na resposta ulcerogênica da mucosa gastrointestinal, dependendo da isoforma da NOS. Ou seja, o NO produzido pela NOSc apresentaria em efeito protetor, e o NO originário da NOSi teria um efeito pró-ulcerogênico (NISHIO *et al.*, 2006).

Sabe-se que a liberação local de NO contribui para a manutenção da integridade do TGI, pela regulação de várias funções (SUGAMOTO *et al.*, 2001). O NO é importante no controle da secreção ácida e alcalina, no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica e na secreção de muco gástrico (BAYIR *et al.*, 2006). O estudo de SUGAMOTO *et al.* (2001), demonstrou que a ação do NO na secreção de  $\text{HCO}_3^-$  induzida por ácido, pelo menos parcialmente, é devido o estímulo realizado pela ação das PG.

### ✓ Prostaglandinas

As prostaglandinas endógenas têm um papel importante mediando muitos aspectos da defesa da mucosa gastrointestinal (MAITY *et al.*, 2003). A principal consequência da redução na produção de PG, que pode contribuir para a patogênese da ulceração da mucosa gastroduodenal, inclui a redução na secreção de muco, inibição da secreção de  $\text{HCO}_3^-$ , redução no fluxo sanguíneo da



mucosa, alteração na estrutura microvascular, e um aumento na secreção ácida gástrica e de pepsinogênio (FORNAI *et al.*, 2005).

As PG geradas em uma úlcera gástrica, pela COX-2, parecem ter um papel crucial na cicatrização das úlceras, estimulando a proliferação celular, promovendo angiogênese e a restauração da integridade da mucosa. Ao contrário da PG produzida pela COX-1, que é constitutiva, responsável pela regulação do fluxo sanguíneo da mucosa e secreção epitelial de muco e  $\text{HCO}_3^-$ , as PG oriundas da COX-2 influenciam na proliferação epitelial e inibição da aderência de leucócitos no endotélio. As PG geradas pela COX-1 inibem a ação da COX-2 no TGI. Em situações onde a mucosa é exposta a agentes lesivos, ou quando a mucosa está lesada, ou com úlceras, há uma inibição da COX-1 e subsequente super expressão da COX-2. Assim, parece que a COX-2 está relacionada com a ulceração e inflamação da mucosa gástrica (Revisado por KONTUREK *et al.*, 2005).

As úlceras gástricas parecem ser um dos principais efeitos adversos dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), os quais são amplamente usados no tratamento da dor, febre e inflamação (BAYIR *et al.*, 2006). Ambos os efeitos dos AINES, adversos e terapêuticos, são atribuídos a sua capacidade de reduzir a produção de PG, através da inibição da COX. Várias linhas de evidência indicam que a patogênese da lesão gastrointestinal induzida por AINES também depende de vias independentes de PG, como fosforilação oxidativa, redução na proliferação celular da mucosa e ativação de neutrófilos, seguido pelo aumento de adesão endotelial. Estes mecanismos, juntamente com os relacionados à inibição da síntese de PG, conduzem à oclusão de micro vasos e subsequente super produção de metabólitos reativos a oxigênio. Estas substâncias são capazes de induzir lesão tecidual oxidativa, que parece ter papel importante na patofisiologia da ulceração digestiva induzida por AINES (FORNAI *et al.*, 2005).

Pesquisas baseadas nos estudos da atividade dos dois tipos de COX, culminaram com o desenvolvimento dos inibidores seletivos da COX-2, os COXIBs. Estes compostos prometem promover inibição específica e efetiva sobre a COX-2, induzida/inflamatória, poupando a atividade da COX-1, fisiológica.

Entretanto, o conceito de que uma única e exclusiva isoforma da COX esteja implicada nos processos de homeostase/patogenia tem sido questionado (MOREAU *et al.*, 2005).

#### ✓ **Enzimas antioxidantes**

O metabolismo celular normal envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Porém, a geração excessiva de ROS pode afetar prejudicialmente o funcionamento celular. As ROS causam inflamação e morte celular, através da modulação das vias de transdução do sinal, por afetar as enzimas redox-sensíveis e fatores de transcrição, por auxiliar a atividade de proteases, e por estimular a expressão de mediadores inflamatórios e moléculas de adesão (UZUN *et al.*, 2005).

As ROS são produzidas como consequência da respiração aeróbica e da oxidação de substratos, e causam danos oxidativos nos tecidos. As ROS incluem radicais livres como os radicais hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ), ou ânions superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) e espécies de radicais não livres, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). O papel das ROS na patogênese das lesões gástricas experimentais agudas induzidas por estresse, etanol e AINES é bem conhecido. Causam peroxidação lipídica nas membranas, por atacar ácidos graxos insaturados. Quando atacam o DNA celular, pode promover a formação de câncer como consequência de uma mutação (BAYIR *et al.*, 2006).

Organismos aeróbicos possuem sistemas de defesa antioxidantes, incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos contra efeitos tóxicos das ROS. Estes antioxidantes são a superóxido desmutase (SOD), glutational peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutational reduzida (GSH), glutational redutase (GR),  $\alpha$  - tocoferol, vitamina C,  $\beta$  - caroteno, vitamina A e flavonóides (BAYIR *et al.*, 2006).

Os compostos sulfidrílicos estão envolvidos na manutenção da integridade gástrica, principalmente quando as ROS estão envolvidas na patofisiologia da lesão tecidual. A GSH participa em muitos aspectos do metabolismo oxidativo, incluindo remoção de hidroperóxidos, proteção contra radiação ionizada,

manutenção do padrão fisiológico de proteínas sulfidrílicas, e a condensação com xenobióticos ou compostos reativos endógenos, para ajudar na sua detoxificação e excreção. É relatado que o ciclo redox da GSH está especificamente envolvido na proteção das células epiteliais gástricas contra a lesão promovida pelo etanol (NATALE *et al.*, 2004).

### ❖ *Helicobacter pylori*

O *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria Gram-negativa, que não forma esporos, possui flagelo polar e que cresce em ambiente micro-aerófilo. É encontrado na superfície da mucosa gástrica de hospedeiros, abaixo da camada de muco. Em função da sua localização, a bactéria se encontra protegida da ação do ácido gástrico (HILL, 1997).

A ocorrência da infecção gástrica por *H. pylori* é alta no mundo inteiro e atinge 40 % e 80 % nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente. Apesar das numerosas pesquisas, o seu modo de transmissão na população permanece desconhecido. Existem relatos que ambas vias de transmissão, oral-oral e oral-fecal, ocorre em humanos. O homem parece ser o principal reservatório do agente infeccioso (CZESNIKIEWICZ-GUZYK *et al.*, 2005)

O *H. pylori* apresenta como fatores de virulência os fatores de colonização gástrica: os flagelos, a enzima urease e fatores de adesão (codificados pelos genes BabA e BabB); e os fatores lesivos a mucosa: produtos da urease, LPS, quimiocinas, citocinas (CagA e VagA), proteínas pró-inflamatórias, proteínas do choque térmico ("heat shock protein" - HspA e HspB), proteases que hidrolisam proteínas do muco, e produção de NO que promove lesões nas células do hospedeiro (Revisado pro KONTUREK *et al.*, 2006).

O *H. pylori* é conhecido por causar muitas doenças gástricas, incluindo úlceras pépticas e câncer gástrico. Na ausência de erradicação, a infecção tende ter vida longa e a resposta imune é inefetiva no combate ao agente. Na maioria dos casos de infecção natural, a resposta imune do hospedeiro direciona para inflamação crônica, promovendo atrofia e neoplasia da mucosa. Com a

erradicação do organismo infeccioso a inflamação tende a resolução, o que, em muitos casos, pode resultar na redução do risco de atrofia e câncer gástrico (Revisado por FOX e WANG, 2002).

Os danos na mucosa gástrica proporcionado pelo *H. pylori* são resultado da sua capacidade de chegar até as células da mucosa gástrica e promover danos, acompanhados pelo aumento da expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 8 e TNF- $\alpha$ . Esta ação afeta a secreção ácida gástrica e altera a taxa gastrina-somatostatina, assim como a atividade secretora das células mucosas, produtoras de muco/ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, e a qualidade de aderência da camada de muco, resultando na gastrite aguda e, posteriormente, crônica (Revisado por KONTUREK *et al.*, 2005). A indução pelo *H. pylori* de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento é mediado pelas vias de sinalização das quinases de proteínas ativadas por mitógenos (MAPK) e do fator nuclear de transcrição K - B (Revisado por FOX e WANG, 2002). A bactéria também induz a formação de COX-2, afetando os mecanismos protetores da mucosa, pela geração de substância pró-inflamatórias, incluindo as ROS. Isto reitera a afirmação de que a erradicação da bactéria pode restaurar, pelo menos em parte, o distúrbio na integridade da mucosa e reverter o curso da gastrite (Revisado por KONTUREK *et al.*, 2005).

Conforme as informações relacionadas à etiopatogenia da doença, é possível observar a complexidade do tratamento a ser empregado nos pacientes acometidos por esta enfermidade. Aplicam-se a estes casos, de acordo com o estágio em que se encontra o distúrbio, desde antiácidos, medicamento paliativos que consistem apenas em neutralizar a secreção ácida do estômago, até os inibidores de bomba de prótons, os quais diminuem a secreção ácida do estômago. Os inibidores de bomba são considerados na atualidade, juntamente com o metronidazol e a amoxicilina, a terapia triplíce indicada como tratamento de primeira escolha (RANG *et al.*, 2003).



## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos e os mecanismos de ação envolvidos na atividade protetora gástrica dos extratos brutos, e das frações destes extratos, obtidos das raízes da *Arctium lappa* L. (Bardana).

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar qual dos extratos, etanólico ou clorofórmico, obtidos do pó das raízes da Bardana (*Arctium lappa* L.) é o mais eficaz na proteção da mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo etanol.
2. Avaliar qual dos extratos, etanólico ou clorofórmico, obtidos do pó das raízes da Bardana (*Arctium lappa* L.) é o mais efetivo na proteção da mucosa gástrica contra lesões crônicas, induzidas pelo ácido acético.
3. Avaliar a ação antioxidante *in vitro* (sobre o DPPH) dos extratos brutos etanólico e clorofórmico, e das frações obtidas do extrato bruto clorofórmico.
4. Avaliar qual dos extratos, etanólico ou clorofórmico, obtidos do pó das raízes da Bardana (*Arctium lappa* L.) é o mais potente na redução da secreção ácida gástrica, utilizando o modelo de ligadura do piloro.
5. Avaliar, *in vitro*, a ação dos extratos, etanólico e clorofórmico, obtidos do pó das raízes da Bardana (*Arctium lappa* L.) sobre a atividade da  $H^+, K^+$  ATPase.
6. Avaliar as alterações produzidas pelos extratos, etanólico e clorofórmico, obtidos do pó das raízes da Bardana (*Arctium lappa* L.) sobre a motilidade gastrointestinal.
7. Identificar as frações mais efetivas do extrato mais potente, obtidas por meio de seu fracionamento cromatográfico orientado pela atividade biológica (biomonitorado).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Material Botânico

###### 3.1.1.1 Origem

A *Arctium lappa* L. foi fornecida pela Fazenda Solidariedade, da Fundação de Ação Social (FAS). A área para cultivo e as plantas matrizes foram selecionadas pela farmacêutica industrial Jorgeth A. G. Xavier. As raízes coletadas em novembro de 2003, foram cortadas, secas em estufa e embaladas em sacos plásticos e de papel. Os sacos, devidamente identificados, foram armazenados em galpões apropriados, no laboratório da própria fazenda, e posteriormente enviados ao laboratório do Departamento de Farmacologia (UFPR). Uma exsicata foi identificada com o nº 37173 e está depositado no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

###### 3.1.1.2 Preparação do extrato

Os extratos das raízes da Bardana foram fornecidos pelo Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti. Os fracionamentos foram realizados após as informações dos resultados das atividades biológicas (fracionamento biomonitorado).

Para a obtenção do extrato bruto clorofórmico (EBC), 7 kg do pó das raízes da Bardana foi percolado com 19 L de clorofórmio. Após a concentração em rotaevaporador, foi obtido 64 g do EBC. Em seguida a percolação com clorofórmio, o mesmo material (planta) foi percolado com 14 L de etanol e após a

evaporação do solvente, em rotaevaporador, foi obtido 210 g do extrato bruto etanólico (EET).

As frações foram obtidas a partir de 20 g do extrato bruto clorofórmico, que foi fracionado em coluna de sílica gel, usando como eluente um gradiente hexano/acetato de etila seguido de gradiente acetato de etila/etanol. Com este fracionamento, foram obtidas 62 frações que, após a análise por cromatografia em camada fina, foram reunidas em grupos conforme a similaridade do perfil cromatográfico. As frações FR 7 (mistura - fração A), FR 48 (fração B), FR 54 (fração C), FR 31-43 (fração D) e FR 11-12 (fração E) apresentaram precipitado sólido, os quais foram purificados por re-precipitação em acetato de etila e acetona.

### **3.1.2 Animais**

Foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*, linhagem Wistar) adultos, fêmeas, pesando de 180 a 250 g, e camundongos (*Mus musculus*, linhagem Swiss) adultos, fêmeas, pesando de 25 a 35 g, fornecidas pelos Biotérios do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e da TECPAR (PR). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e iluminação (12 h claro/escuro), tendo livre acesso à água e ração, sendo que em alguns experimentos os animais foram mantidos em jejum de 6 - 18 horas. Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) albino, machos adultos, com peso entre 1 e 2 kg, foram adquiridos na Cooperativa dos Produtores do Estado do Paraná (Coelho Brasil), São José dos Pinhais (PR), e transportados imediatamente para a execução do experimento. Os protocolos experimentais que utilizaram animais estão de acordo com as normas internacionais e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR, com o número de protocolo 160.

### **3.1.3 Drogas, Reagentes, Solventes e Sais**



Utilizou-se: ácido sulfúrico, cloreto de sódio, fosfato de potássio (Merck do Brasil, Rio de Janeiro, Brasil), adenosina 5-trifosfato (ATP), alcian blue, atropina, coquetel inibidor de ATPase, ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (DTNB), molibdato de amônio, glutatona forma reduzida, ácido etilenoglicol-tetracético (EGTA), albumina bovina, 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), omeprazol (Sigma, Saint-Louis, EUA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil), ácido L-ascórbico, sacarose (Synth, Diadema, Brasil), álcool metílico (Ecibra, Santo Amaro, Brasil), álcool etílico P.A 95%, ácido tricloroacético P.A, hidróxido de sódio, vermelho de fenol (Vetec, Duque de Caxias, Brasil), cloreto de magnésio, cloreto de potássio (Carlo Erba, Rodano, Itália), fenoltaleína (FarmanilQuima, Curitiba, Brasil), Éter etílico P.A (Biotec, São José dos Pinhais, Brasil), metoclopramida (Aventis) e carboximetilcelulose.

#### **3.1.4 Equipamentos**

Utilizou-se: agitador de tubos (AP56 Phoenix), agitador de eppendorfs (Marconi), agitador magnético (Fisatom), balanças analíticas (AL500 Marte, AS200 Ohaus, AC210S Sartorius), centrífuga refrigerada (Christ), concentradores rotatórios (Centrivap 78100-00 e SK5684 Eberle), dispensador (Boeco), espectrofotômetro (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech), homogeneizador (MA 102 Marconi), estufa (Odontobras), leitor de placas (Tecsán), pipetas automáticas Eppendorf), titulador automático (Hirschmann Laborgate), ultra-som (Unique), ultra-centrífuga (HITACHI Himac CP90B).

### **3.2 METODOLOGIA**

### 3.2.1 Avaliação da atividade antiulcerogênica

#### 3.2.1.1 Lesões gástricas induzidas por etanol (ROBERT *et al.*, 1979)

Os animais (ratas) foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água. Grupos de 6 animais foram tratados oralmente com o veículo (C: água - 0,1 mL/100 g), omeprazol (O: 40 mg/kg) e o extrato (em 3 doses). Sessenta minutos após os tratamentos com o extrato, água e omeprazol, foi administrado etanol (70 % e 80 %, 0,5 mL/animal - vo). Uma hora após a administração do agente necrotizante, os animais foram mortos através de deslocamento cervical e os estômagos processados como descrito no item a seguir.

##### 3.2.1.1a Avaliação das lesões gástricas nos modelos agudos

###### Determinação do índice de úlceras

O índice de úlceras foi determinado pela contagem direta das lesões menores ou iguais a 1 mm (1 ponto). Quando maiores, o comprimento de cada lesão na mucosa glandular foi medido e quantificado atribuindo-se 1 ponto para cada mm. No caso de úlceras perfuradas, estas também são medidas e cada mm<sup>2</sup> de lesão é multiplicado por 5 pontos (5 pontos/mm<sup>2</sup>).

#### 3.2.1.2 Lesões gástricas induzidas por ácido acético (TAKAGI *et al.*, 1969)

Grupos de ratas foram submetidas a uma dieta alimentar (fornecimento de ração: 9h30 -10h30 e 15h30 -16h30) durante 3 dias antes da indução da lesão. Após esse período, os animais foram anestesiados com éter etílico e a laparotomia foi realizada. O estômago foi exposto e injetou-se 50 µL de ácido acético 20% na subserosa da parede gástrica anterior. O estômago foi lavado cuidadosamente com salina 0,9% e a parede abdominal foi suturada. Após a recuperação da anestesia, os animais retornaram ao biotério e continuaram sob regime de restrição alimentar, com livre consumo de água. Os tratamentos foram

iniciados sete dias após a cirurgia, administrando-se o veículo (água - 0,5 mL/100 g), o omeprazol (20 mg/kg) e as diferentes doses do extrato por via oral, 30 minutos após o consumo de ração, duas vezes por dia, durante sete dias.

Ao final deste período de tratamento, os animais foram mortos, os estômagos removidos e esticados para posterior inspeção da mucosa.

### 3.2.1.2a Avaliação das lesões gástricas nos modelos crônicos

#### Determinação do índice de lesão gástrica crônica

O índice de lesão foi calculado pela multiplicação dos pontos obtidos na observação da mucosa, considerando os parâmetros comprimento, largura e profundidade das lesões (mm<sup>3</sup>). Os resultados correspondentes aos valores calculados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias.

### 3.2.2 Avaliação da atividade antioxidante

#### 3.2.2.1 Estudo *in vitro* da atividade seqüestradora de radicais livres (DPPH)

A reatividade dos extratos da Bardana com o radical livre estável 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) foi determinada através de medidas de alteração da absorbância a 517 nm, de acordo com o método descrito por BLOIS (1958) e CHEN *et al.* (2004), com algumas modificações. O sistema de reação foi constituído de 750  $\mu$ L de solução teste (extrato) e 250  $\mu$ L de solução metanólica de DPPH (1 mg em 25 mL). Após 5 minutos, o decréscimo da absorbância foi medido. Solução do agente redutor ácido ascórbico (50  $\mu$ g/mL) foi utilizada como controle positivo do teste e como grupo controle negativo foi adicionado água com 0,32 % de DMSO (veículo).

### 3.2.3 Avaliação da atividade anti-secretora ácida

#### 3.2.3.1 Ligadura de Píloro (SHAY *et al.*, 1945)

Os animais foram mantidos em jejum de 15 a 18 horas com acesso livre a água. Ratas foram anestesiadas com éter e colocadas em decúbito dorsal em uma placa de isopor. Através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, foi localizado o estômago e procedido a ligadura do piloro com linha. Por via intraduodenal, os animais recebem o veículo (C: água - 0,1 mL/100 g) e o extrato (em 3 doses). O grupo omeprazol (O: 40 mg/kg) recebeu o tratamento vo, 40 minutos antes da ligadura do piloro, sendo administrado o mesmo volume de salina intraduodenal. A seguir, foi suturada a parede abdominal. Quatro horas após a cirurgia, os animais foram mortos com anestesia etérea profunda e seus estômagos removidos após pinçamento do esôfago para evitar perda do material secretado. O órgão foi lavado com água, seco em gaze e aberto ao longo da curvatura menor. A mucosa foi lavada com 3 mL de água destilada, recolhendo-se o conteúdo gástrico em tubos de ensaios para a centrifugação (1500 rpm durante 30 minutos). Após a centrifugação, o volume gástrico foi quantificado em proveta e colocado em béqueres. A acidez total ( $\text{mEq}[\text{H}^+]/\text{mL}/4 \text{ h}$ ) foi quantificada por titulação simples com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2 % como indicador ácido-base (DOMER, 1971).

### 3.2.3.2 Estudo da atividade na $\text{H}^+$ , $\text{K}^+$ ATPase *in vitro*

#### 3.2.3.2a Isolamento das vesículas gástricas de coelho

O coelho foi morto por concussão cerebral. O estômago foi extraído, acondicionado em banho de gelo, aberto pela curvatura menor, lavado e foram descartadas as regiões antral e cardial. A mucosa do corpo gástrico foi rapidamente separada das camadas muscular e submucosa. A mucosa gástrica foi picada em pedaços menores, pesada, transferida para o tampão de homogeneização (Tris HCL 50 mM - pH 7,4 - sacarose 250 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, KCl 5 mM, EDTA 1 mM e coquetel de inibidores de protease 0,01 %) e homogeneizada. O homogenato foi centrifugado a 9000x g por 40 minutos, o precipitado foi descartado e o sobrenadante novamente centrifugado a 100000x g

por 1 h, obtendo-se um precipitado com as vesículas da membrana apical contendo a  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase não purificada (KUBO *et al.*, 1995).

#### 3.2.3.2b Purificação da $H^+$ , $K^+$ ATPase de coelho

Realizado por centrifugação, em gradiente descontínuo de sacarose segundo método de KUBO *et al.* (1995). O precipitado contendo a  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase foi suspenso novamente em tampão de homogeneização (sacarose 250 mM,  $MgCl_2$  2 mM, ácido etilenoglicol-tetracético (EGTA) 1 mM e Tris.HCl 50 mM - pH 7,4) e foi cuidadosamente adicionado a uma solução de sacarose 30 % (1:3). Os tubos foram centrifugados a 100000x g por 2 h. Duas bandas e um precipitado foram obtidos. As membranas sedimentadas na superfície da solução de sacarose 30 % foram coletadas. Todos os procedimentos foram realizados a 4 °C. O material enzimático foi congelado e guardado a -70 °C.

A quantificação protéica foi realizada através do kit de análise protéica BCA - Pierce, utilizando albumina bovina como padrão.

#### 3.2.3.2c Ensaio da atividade enzimática da $H^+$ , $K^+$ ATPase

A atividade ATPásica foi determinada mediante a quantificação do fósforo inorgânico ( $P_i$ ) liberado pela hidrólise de ATP exógeno, na presença de  $K^+$ . A reação foi iniciada pela adição de proteína enzimática a 150  $\mu$ L de tampão Tris.HCl (pH 7,4) contendo cloreto de magnésio 2,5 mM, cloreto de potássio 20 mM e ATP, na ausência e na presença dos extratos testados. A reação foi interrompida, após 20 minutos de incubação a 37 °C, pela adição de 50  $\mu$ L de ATC 50 % e esfriamento rápido em banho de gelo (MURAKAMI *et al.*, 1992). A quantificação de fosfato inorgânico liberado foi realizada através da adição de 900  $\mu$ L da solução reagente (4,7 mL de água; 0,7 mL de ácido sulfúrico 10 N; 0,6 mL de molibdato de amônio 2,4 %; e 3 mL de ácido ascórbico 10 %) nas amostras, que foram incubadas por 20 minutos a 37 °C. O produto foi obtido e quantificado

por leitura espectrofotométrica a 820 nm (FISKE e SUBBAROW, 1925). A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de extinção do Pi ( $\epsilon = 11000/\text{M}/\text{cm}$ ).

### **3.2.4 Avaliação da motilidade intestinal**

#### **3.2.4.1 Esvaziamento gástrico**

Grupos de 7 animais (camundongos) foram tratados com o veículo (grupo C: controle, água, via oral), com atropina (A: 3,0 mg/kg, via subcutânea), metoclopramida (M: 30 mg/Kg, via oral) e com 3 doses do extrato em estudo. Uma hora (vo) ou 30 minutos (ip) após os tratamentos, os animais receberam por gavagem 0,5 mL de um marcador colorido semi-sólido (vermelho de fenol 0,5 % em carboximetilcelulose 1,5 %). Transcorridos 20 minutos desta administração, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, a cavidade abdominal foi aberta, o piloro e a parte distal do esôfago foram pinçados, o estômago foi retirado com seu conteúdo e então aberto e lavado com 7 mL de água destilada. O conteúdo gástrico coletado foi centrifugado a 1500 rpm, 30 min. A 600  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado igual volume de NaOH 0,025 N (pH 12) e a solução obtida foi lida em espectrofotômetro a 560 nm. Também foi realizada uma curva controle (tempo zero), através de um grupo de 7 animais que receberam vermelho de fenol (0,5 mg/mL) e logo após foram sacrificados, sendo assim considerados com 0% de esvaziamento. Os resultados expressos em porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero (SCARPIGNATO *et al* , 1980).

#### **3.2.4.2 Trânsito intestinal**

Após a retirada do estômago, para avaliação do esvaziamento gástrico, foi retirado o intestino delgado para a avaliação da distância percorrida pelo vermelho de fenol. Com auxílio de uma régua, foi medido o comprimento total

do intestino delgado de cada animal desde o piloro até a válvula íleo-cecal, bem como a distância percorrida pelo vermelho de fenol até a última porção que contenha, pelo menos, 1 cm contínuo do marcador. Os resultados destas medidas foram expressos em porcentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado (STICKNEY e NORTHUP, 1959).

### 3.3 EXPRESSÃO DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados como as médias  $\pm$  erro padrão das médias de 6 - 7 animais por grupo nos experimentos *in vivo* e amostras em triplicata nos experimentos *in vitro*. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. As análises foram realizadas usando o Programa para *Windows*, *GraphPad Prism* versão 3.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Um valor de *p* menor que 0,05 foi considerado significativo.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DOS EXTRATOS DA BARDANA

#### 4.1.1 Avaliação da atividade protetora do extrato bruto etanólico contra as lesões gástricas induzidas de forma aguda

O omeprazol (40 mg/kg) e o EET nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg foram capazes de proteger a mucosa gástrica, reduzindo a área lesada de  $183 \pm 2,7 \text{ mm}^2$  do controle para  $46,0 \pm 8,5$ ;  $18,4 \pm 8,5$ ;  $80,4 \pm 10,8$  e  $75,8 \pm 9,7 \text{ mm}^2$  respectivamente (Figura 4.1).

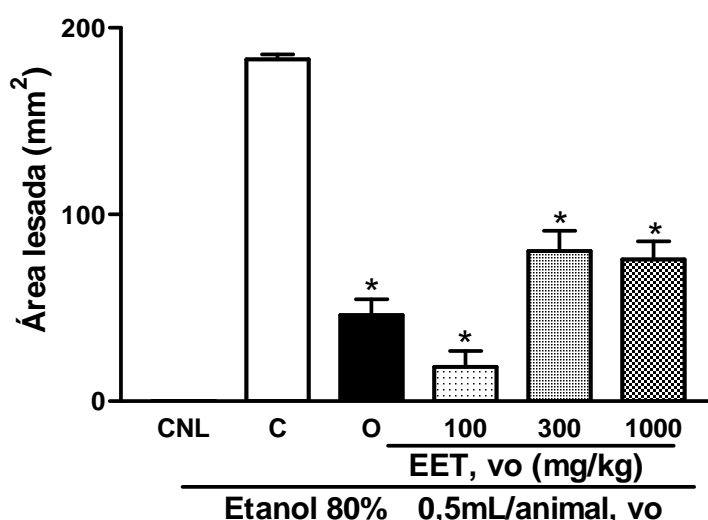


Figura 4.1: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre as lesões gástricas induzidas pelo etanol 80%, em ratos. O CNL corresponde ao grupo controle não lesado, o C ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$ .

#### 4.1.2 Avaliação da atividade protetora do extrato bruto clorofórmico contra as lesões gástricas induzidas de forma aguda



O omeprazol (40 mg/kg) e o EBC, nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg, foram capazes de proteger a mucosa gástrica contra as lesões produzidas pela administração do etanol, reduzindo o índice de lesão do grupo controle de  $43,7 \pm 6,3 \text{ mm}^2$  para  $3,5 \pm 1,1$ ;  $9,2 \pm 4,0$ ;  $6,6 \pm 2,8$  e  $0,42 \pm 0,42 \text{ mm}^2$  respectivamente (Figura 4.2).

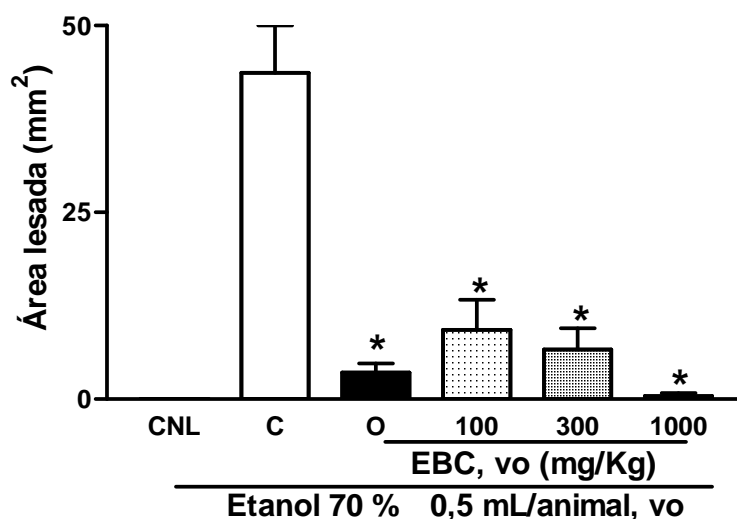


Figura 4.2: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre as lesões gástricas induzidas pelo etanol 70%, em ratos. O CNL corresponde ao grupo controle não lesado, o C ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$ .

Conforme pode ser observado na figura 4.3, todos os tratamentos realizados (omeprazol, 40 mg/kg; EBC 10, 30 e 100 mg/kg) foram capazes de reduzir o índice de úlcera produzido pelo etanol de  $183 \pm 2,7 \text{ mm}^2$  no controle para  $46,0 \pm 8,5$ ;  $70,4 \pm 4,2$ ;  $55,2 \pm 8,5$  e  $43,6 \pm 14,8 \text{ mm}^2$ , respectivamente.

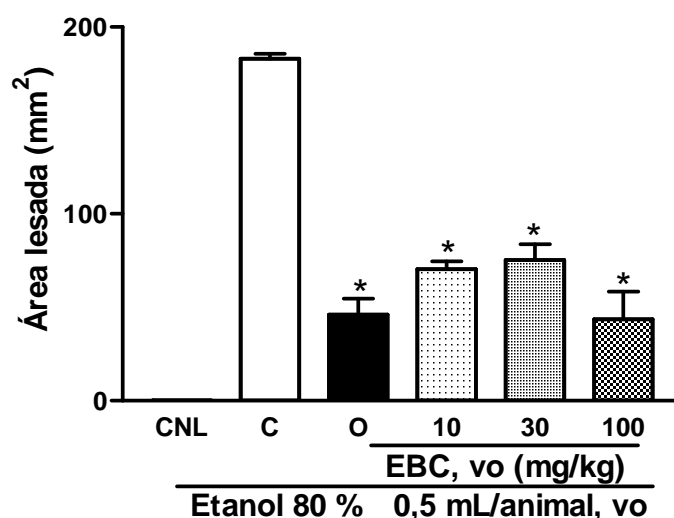


Figura 4.3: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre as lesões gástricas induzidas pelo etanol 80%, em ratos. O CNL corresponde ao grupo controle não lesado, o C ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$ .

#### 4.1.3 Avaliação da atividade protetora do extrato bruto etanólico contra as lesões gástricas induzidas de forma crônica

O tratamento dos animais com omeprazol (20 mg/kg) e com o EET nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, durante 7 dias, 2 vezes por dia, levou a uma redução nas lesões da mucosa gástrica de  $176,6 \pm 17,6 \text{ mm}^3$  no grupo controle para  $59,5 \pm 3,6$ ;  $36,8 \pm 9,5$ ;  $62 \pm 7,6$  e  $77,4 \pm 17,4 \text{ mm}^3$  respectivamente (Figura 4.4).

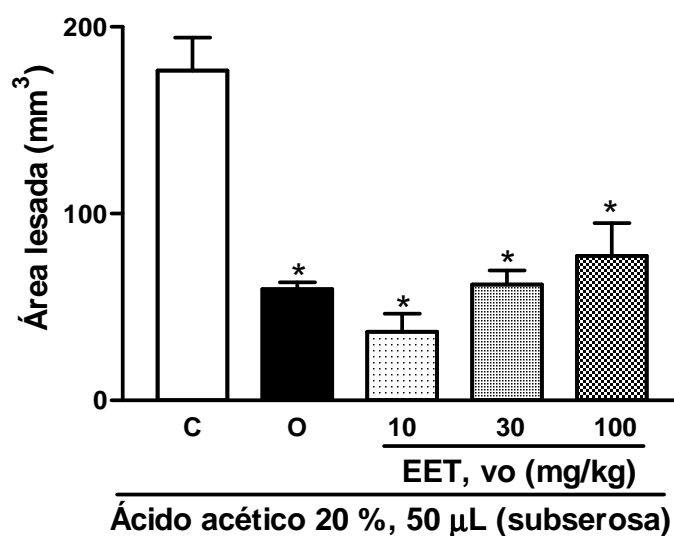


Figura 4.4: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre as lesões gástricas crônicas, induzidas pelo ácido acético 20%, em ratos. O C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (20 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$ .

#### 4.1.4 Avaliação da atividade protetora do extrato bruto clorofórmico contra as lesões gástricas induzidas de forma crônica

Os grupos de animais tratados com EBC na dose de 100 mg/kg e omeprazol (20 mg/kg), durante 7 dias, 2 vezes por dia, apresentaram uma redução no índice de lesões da mucosa gástrica de  $176,6 \pm 17,6 \text{ mm}^3$  observado no grupo controle, para  $84,2 \pm 12,0$  e  $50,8 \pm 5,9 \text{ mm}^3$  respectivamente (Figura 4.5).

Os grupos tratados com EBC, nas doses de 10 e 30 mg/kg não apresentam alteração da área lesada pelo ácido acético.

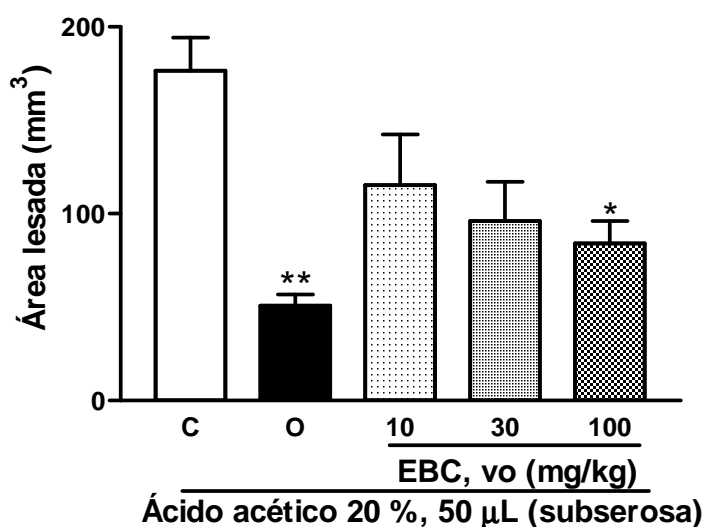


Figura 4.5: Efeito do extrato bruto etanólico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre as lesões gástricas crônicas, induzidas pelo ácido acético 20%, em ratos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (20 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$  e (\*\*)  $P < 0,001$ .

## 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DA BARDANA

### 4.2.1 Determinação da atividade antioxidante do extrato bruto etanólico através de metodologia *in vitro*

A capacidade antioxidante do ácido ascórbico (50 µg/mL) e do EET, nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/mL, foi observada através da redução de DPPH do grupo controle de  $0,25 \pm 0,01$  nm para  $0,08 \pm 0,004$ ;  $0,15 \pm 0,03$ ;  $0,1 \pm 0,002$  e  $0,08 \pm 0,009$  nm respectivamente (Figura 4.6). O EET na concentração de 1 µg/mL não foi capaz de alterar a quantidade de DPPH.

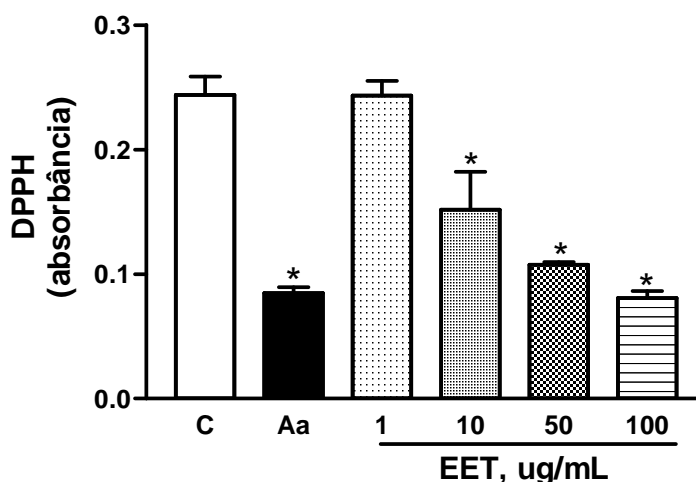


Figura 4.6: Efeito antioxidante do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o DPPH, *in vitro*. C corresponde ao grupo controle e Aa ao grupo ácido ascórbico (50 µg/mL). Os resultados estão expressos em média ± EPM (erro padrão da média) das absorbâncias. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$  (n=3).

#### 4.2.2 Determinação da atividade antioxidante do extrato bruto clorofórmico através de metodologia *in vitro*

O ácido ascórbico (50 µg/mL) e o EBC (250 µg/mL) foram efetivos em reduzir a quantidade de DPPH de  $0,2 \pm 0,02$  nm no grupo controle para  $0,08 \pm 0,004$  e  $0,1 \pm 0,004$  nm, respectivamente (Figura 4.7).

Entretanto, o EET nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, não alterou a quantidade de DPPH (Figura 4.7).

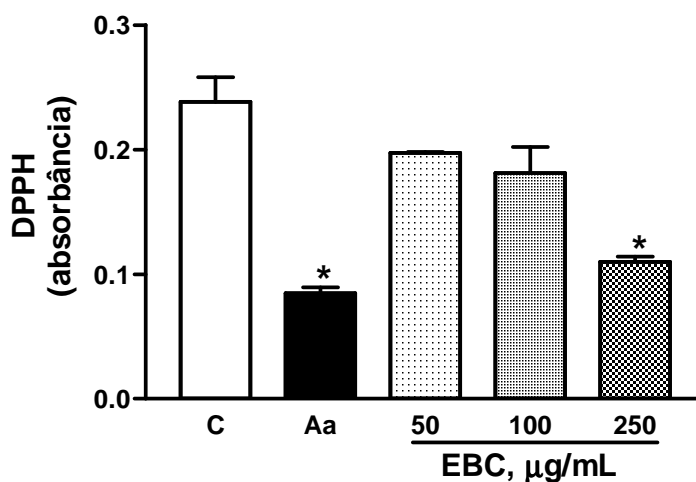


Figura 4.7: Efeito antioxidante do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o DPPH, *in vitro*. C corresponde ao grupo controle e Aa ao grupo ácido ascórbico (50 µg/mL). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) das absorbâncias. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$  ( $n=3$ ).

### 4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-SECRETORA ÁCIDA DOS EXTRATOS DA BARDANA

#### 4.3.1 Avaliação da atividade anti-secretora ácida do extrato bruto etanólico

O volume da secreção gástrica dos animais tratados com o omeprazol (40 mg/kg) e com EET (nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg) não foi reduzido quando comparados ao grupo controle ( $7,8 \pm 0,5$  mL; Figura 4.8).

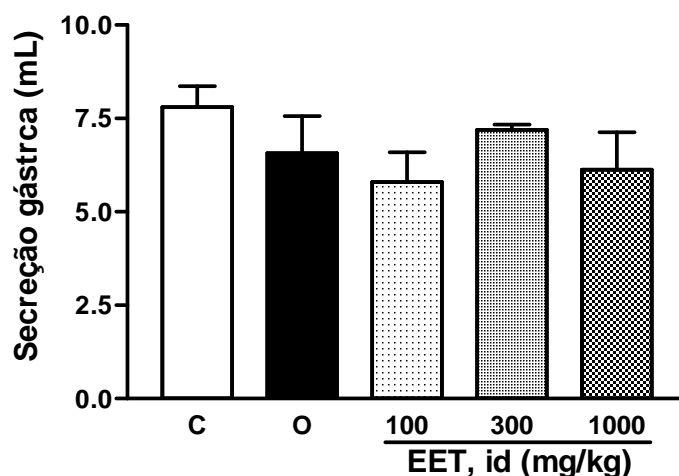


Figura 4.8: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a secreção gástrica, em ratos. O C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/mL). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$ .

A acidez do conteúdo gástrico foi reduzido de  $0,07 \pm 0,003$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL no grupo controle para  $0,01 \pm 0,08$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL e para  $0,04 \pm 0,01$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL após o tratamento com omeprazol (40 mg/mL) e o EET na dose de 100 mg/kg. As doses de 300 e 1000 mg/kg do EET não foram capazes de alterar a acidez total da secreção ácida gástrica (Figura 4.9).

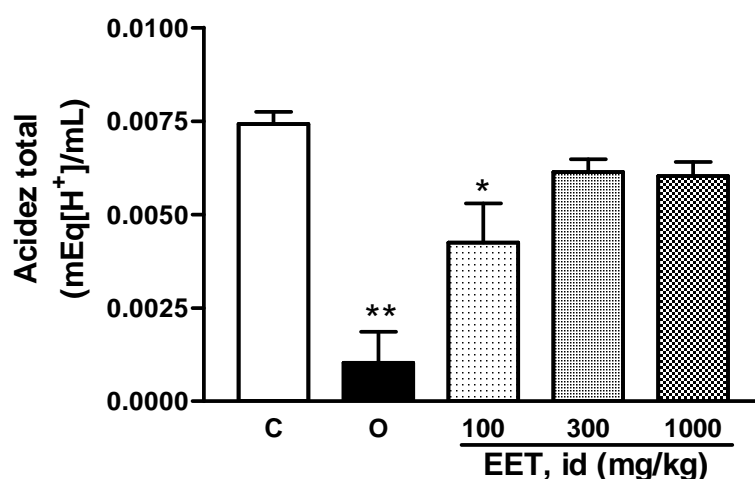


Figura 4.9: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a acidez da secreção gástrica, em ratos. O C corresponde ao grupo controle, tratado com

água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$  e (\*\*)  $P < 0,001$ .

#### 4.3.2 Avaliação da atividade anti-secretora ácida do extrato bruto clorofórmico através de metodologia *in vivo*

O omeprazol (40 mg/kg) e o EBC nas doses de 100, 300 e 600 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente a acidez do conteúdo gástrico de  $0,09 \pm 0,005$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL para  $0,01 \pm 0,003$ ;  $0,07 \pm 0,003$ ;  $0,07 \pm 0,003$  e  $0,06 \pm 0,004$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL respectivamente (Figura 4.10).

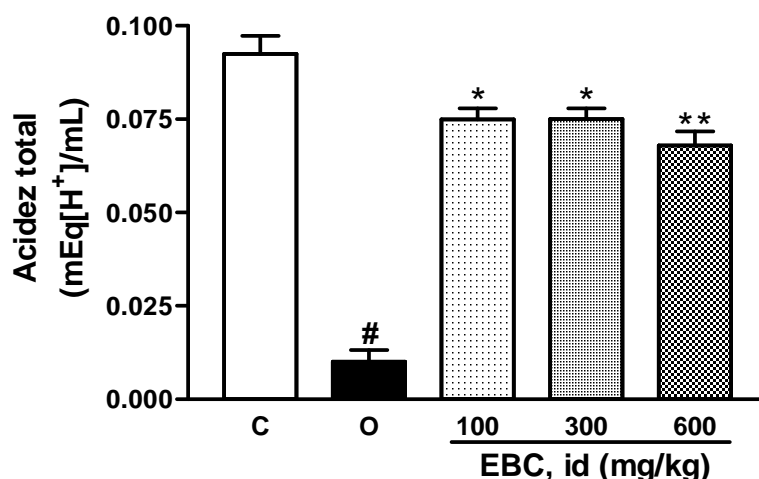


Figura 4.10: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a acidez da secreção gástrica, em ratos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$ , (\*\*)  $P < 0,01$  e (#)  $P < 0,001$ .

O volume da secreção ácida gástrica foi reduzido de  $11,0 \pm 1,2$  mL (controle) para  $4,3 \pm 0,5$  e para  $6,2 \pm 0,6$  mL após os tratamentos com o omeprazol (40 mg/kg) e o EBC na dose de 600 mg/kg, mas não foi alterado com o EBC nas doses de 100 e 300 mg/kg (Figura 4.11).



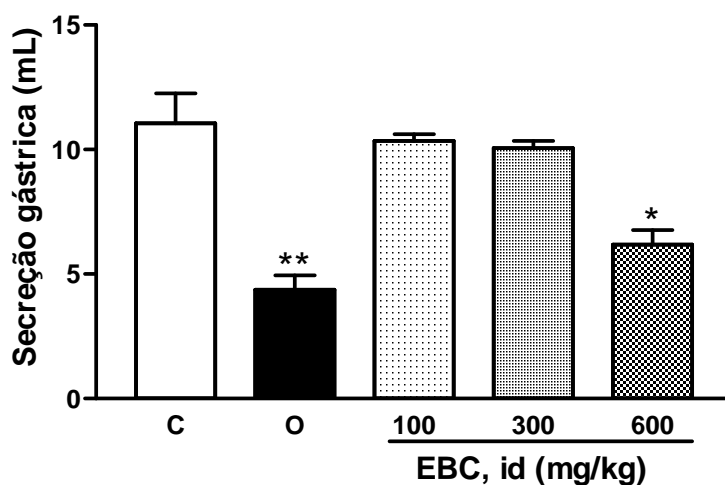


Figura 4.11: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a secreção gástrica, em ratos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$ ; (\*\*)  $P < 0,01$ .

O omeprazol (40 mg/kg) e o EBC na dose de 1000 mg/kg, administrado por via oral, foi capaz de reduzir a acidez da secreção gástrica para  $0,007 \pm 0,005$  e  $0,02 \pm 0,004$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL quando comparado à acidez do grupo controle ( $0,04 \pm 0,004$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL; Figura 4.12).

As doses de 100 e 300 mg/kg do EBC não alteraram a acidez do conteúdo gástrico.

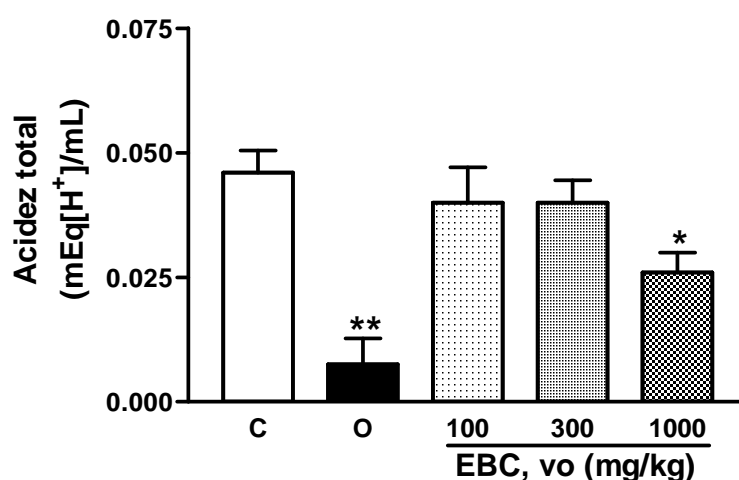


Figura 4.12: Efeito da administração vo do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a acidez da secreção gástrica, em ratos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg). As

colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$  e (\*\*)  $P < 0,001$ .

Quando comparamos o volume de secreção obtida no grupo de animais controle, que foi de  $6,8 \pm 0,4$  mL, observou-se que os tratamentos com o omeprazol (40 mg/kg) e com o EBC na dose de 1000 mg/kg foram capazes de reduzir este volume para  $4,4 \pm 0,5$  e para  $3,9 \pm 0,1$  mL, respectivamente, enquanto que o EBC nas demais doses testadas (100 e 300 mg/kg) não foi capaz de alterar o volume secretado durante o período de 4 horas.

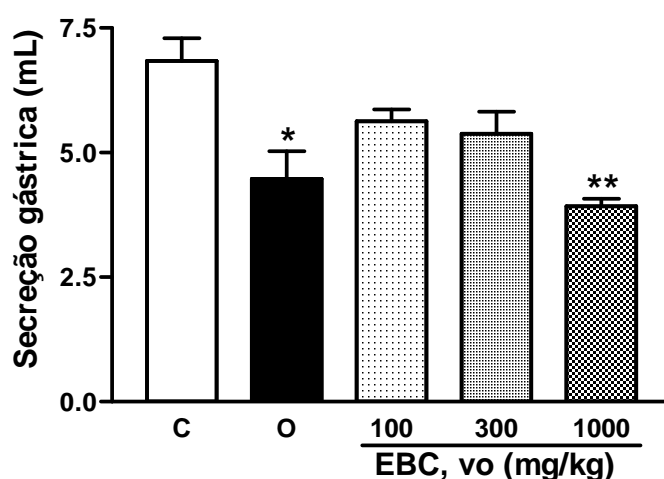


Figura 4.13: Efeito da administração vo do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a secreção gástrica, em ratos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,01$  e (\*\*)  $P < 0,001$ .

O omeprazol (40 mg/kg) e o EBC, administrado por via intraperitoneal, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, foi capaz de reduzir a acidez da secreção gástrica de  $0,03 \pm 0,006$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL no controle para  $0,002 \pm 0,0004$ ;  $0,01 \pm 0,002$ ;  $0,01 \pm 0,002$ ;  $0,01 \pm 0,0$  mEq[H<sup>+</sup>]/mL respectivamente (Figura 4.14)

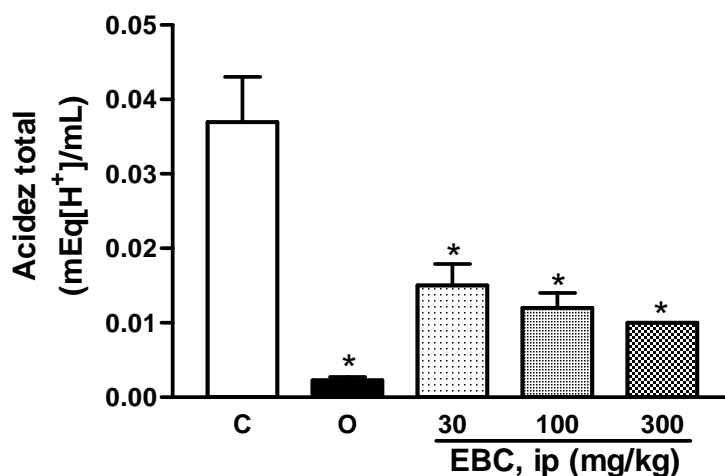


Figura 4.14: Efeito da administração ip do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a acidez da secreção gástrica, em ratos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$ .

O volume da secreção gástrica dos animais tratados com o omeprazol (40 mg/kg) e com o EET nas doses de 100 e 300 mg/kg foi reduzido de  $7,8 \pm 0,5$  mL no grupo controle para  $3,5 \pm 0,1$ ;  $3,6 \pm 0,3$  e  $3,3 \pm 0,1$  mL respectivamente (Figura 4.15).

O tratamento dos animais com EBC na dose de 30 mg/kg, não foi capaz de reduzir o volume da secreção gástrica em comparação ao grupo controle (Figura 4.15).

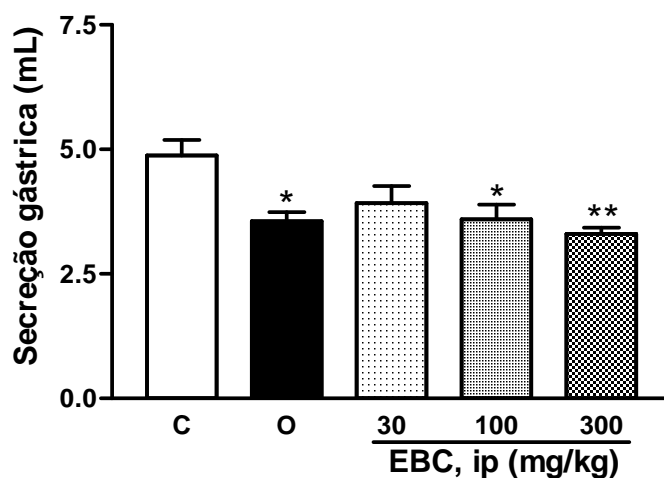


Figura 4.15: Efeito da administração i.p. do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a secreção gástrica, em ratos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo O é o grupo tratado com omeprazol (40 mg/kg). As colunas representam a média de 6 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$  e (\*\*)  $P < 0,01$ .

#### 4.3.3 Determinação da atividade anti-secretora ácida do extrato bruto etanólico através de metodologia *in vitro*

Conforme representado na figura 4.9, a atividade da bomba de prótons foi reduzida de  $5,3 \pm 0,05 \mu\text{M}$  de Pi/mg/minuto no grupo controle para  $3,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$  de Pi/mg/minuto no grupo exposto ao EET na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

O EET nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{g/mL}$  não alterou a atividade da bomba de prótons (Figura 4.16).

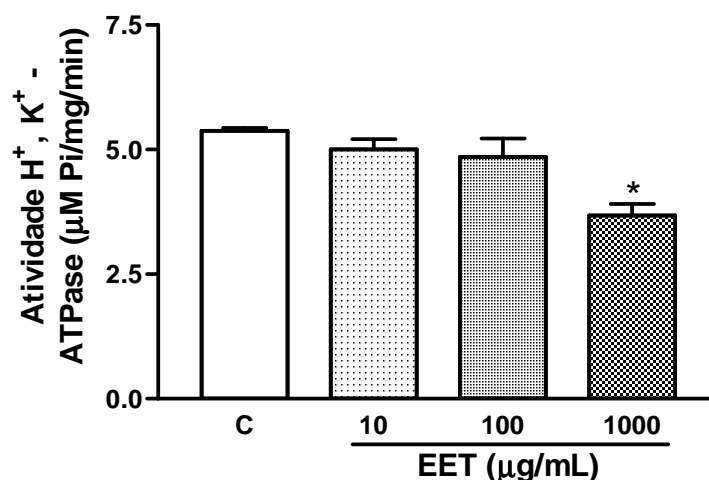


Figura 4.16: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a atividade da H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase gástrica isolada de coelhos. O C corresponde ao grupo controle. Os resultados estão expressos em µM de Pi/mg/minuto de atividade ATPásica. A correlação da atividade ATPásica foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,01$  (n=3).

#### 4.3.4 Determinação da atividade anti-secretora ácida do extrato bruto clorofórmico através de metodologia *in vitro*

Com a adição do EBC nas concentrações de 30, 100 e 300 µg/mL, a atividade da bomba de prótons foi reduzida de  $10,6 \pm 0,8$  µM de Pi/mg/minuto no grupo controle para  $8,2 \pm 0,02$ ;  $2,8 \pm 0,1$ ;  $0,6 \pm 0,1$  µM de Pi/mg/minuto respectivamente (Figura 4.17).

O EBC na concentração de 10 µg/mL não reduziu de forma significativa a atividade da enzima H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase.

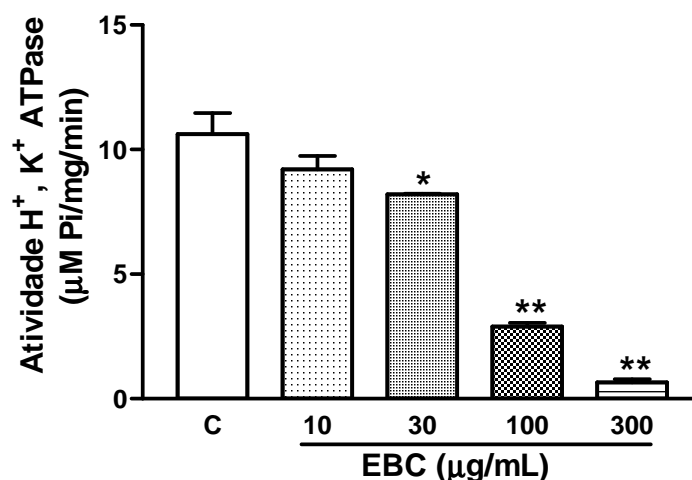


Figura 4.17: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a atividade da H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase gástrica isolada de coelhos. C corresponde ao grupo controle. Os resultados estão expressos em μM de Pi/mg/minuto de atividade ATPásica. A correlação da atividade ATPásica foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$  e (\*\*)  $P < 0,001$ .

#### 4.4 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DA BARDANA SOBRE A MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

##### 4.4.1 Avaliação da atividade do extrato bruto etanólico sobre a motilidade gastrointestinal

O EET nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg, administrados por via oral, não alterou a taxa de esvaziamento gástrico. Somente o grupo de animais tratados com metoclopramida (30 mg/kg) apresentou aumento da taxa de esvaziamento gástrico ( $84,3 \pm 2,6$  %) em comparação com o grupo controle ( $61,7 \pm 5,9$  %; Figura 4.18).

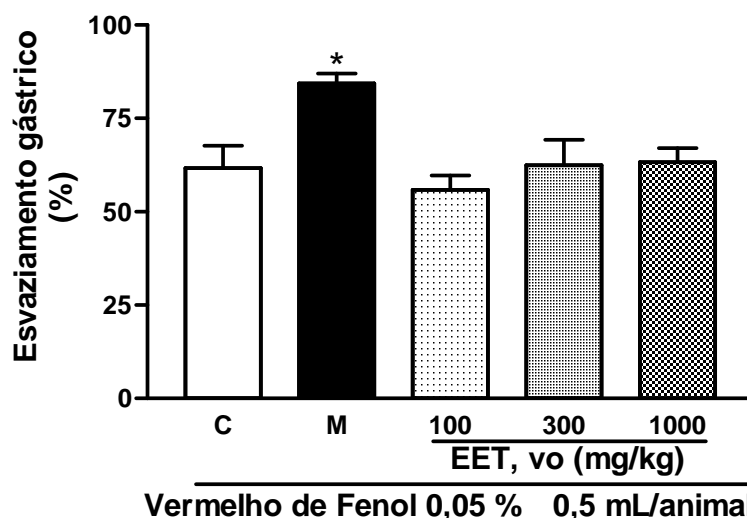


Figura 4.18: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o esvaziamento gástrico, em camundongos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo M é o grupo tratado com metoclopramida (30 mg/kg). As colunas representam a média de 7 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$ .

O EET nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg não promoveu qualquer alteração da taxa de trânsito intestinal em comparação com o grupo controle ( $60,8 \pm 1,8$  %). Apenas o grupo de animais tratado com atropina (3 mg/kg) apresentou redução no percentual de trânsito intestinal para  $33,1 \pm 2,3$  % (Figura 4.19).

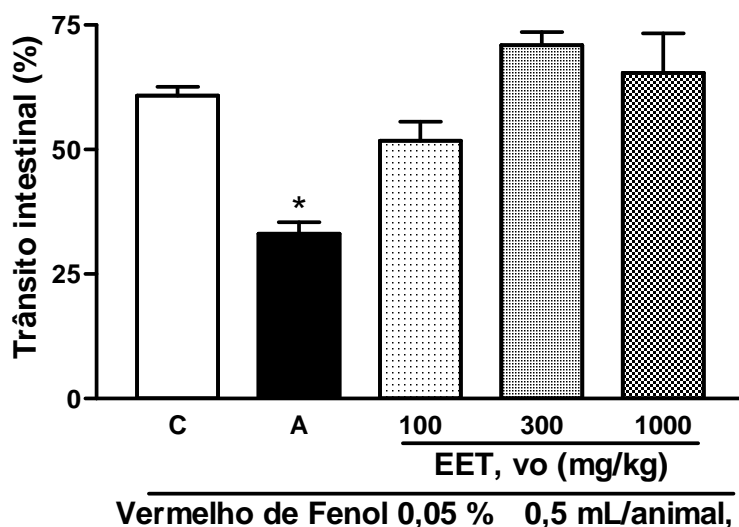


Figura 4.19: Efeito do extrato bruto etanólico (EET) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o trânsito intestinal, em camundongos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo A é o grupo tratado com atropina (3 mg/kg). As colunas representam a média de 7 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$ .

#### 4.4.2 Avaliação da atividade do extrato bruto clorofórmico sobre a motilidade gastrointestinal

O EBC nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg não alterou a taxa de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle ( $52,6 \pm 9,3$  %). Apenas o grupo tratado com metoclopramida (30 mg/kg) apresentou elevação na taxa de esvaziamento gástrico para  $75,9 \pm 2,2$  % (Figura 4.20).



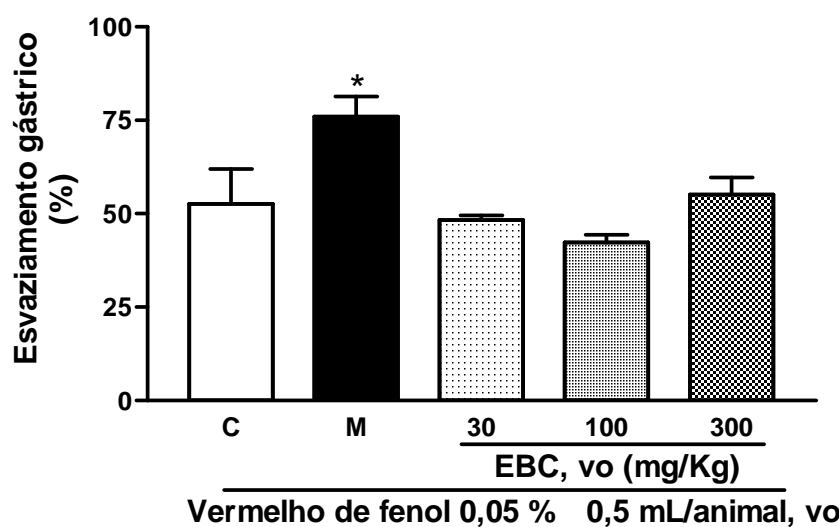


Figura 4.20: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o esvaziamento gástrico, em camundongos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo M é o grupo tratado com metoclopramida (30 mg/kg). As colunas representam a média de 7 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$ .

O EBC nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg não alterou a taxa de trânsito intestinal em comparação ao grupo controle. Apenas o grupo tratado com atropina (3 mg/kg) apresentou redução do percentual de trânsito intestinal de  $66,3 \pm 2,4$  % no grupo controle para  $21,1 \pm 1,6$  % (Figura 4.21).

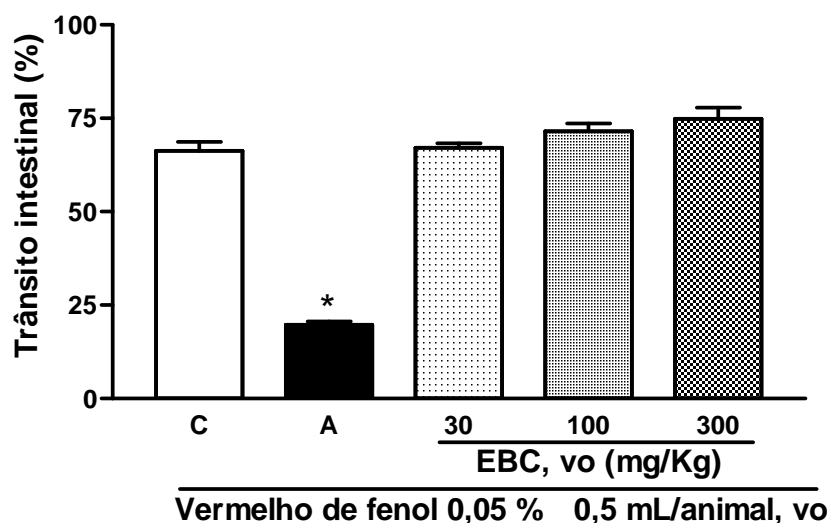


Figura 4.21: Efeito do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o trânsito intestinal, em camundongos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo A é o grupo tratado com atropina (3 mg/kg). As colunas representam a média de 7 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$ .

O EBC, administrado por via oral, na dose de 1000 mg/kg não alterou a taxa de esvaziamento gástrico, enquanto que o grupo tratado com metoclopramida (30 mg/kg) apresentou aumento deste parâmetro, que foi de  $67,6 \pm 4,8$  % no grupo controle para  $84,9 \pm 2,5$  % (Figura 4.22).

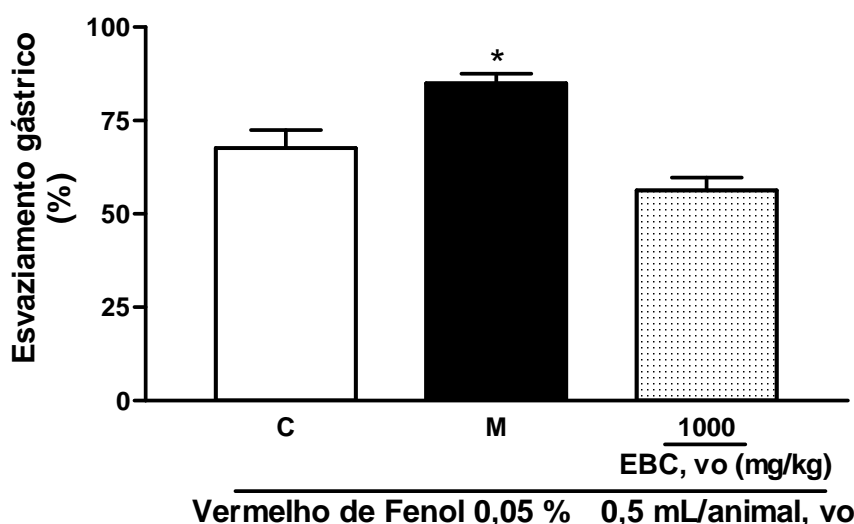


Figura 4.22: Efeito da administração do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o esvaziamento gástrico, em camundongos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo M é o grupo tratado com metoclopramida (30

mg/kg). As colunas representam a média de 7 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$ .

O tratamento dos animais com EBC, por via oral, com a dose de 1000 mg/kg não alterou a taxa de trânsito intestinal, quando comparado ao controle ( $60,8 \pm 1,7$  %; Figura 4.23). Já, o grupo tratado com atropina (3 mg/kg) apresentou redução do percentual de trânsito intestinal para  $33,1 \pm 2,3$  %.

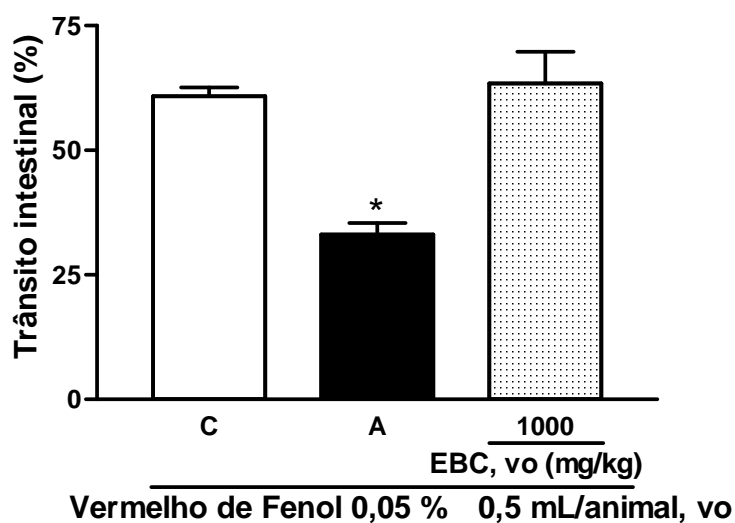


Figura 4.23: Efeito da administração do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o trânsito intestinal, em camundongos. C corresponde ao grupo controle, tratado com água, e o grupo A é o grupo tratado com atropina (3 mg/kg). As colunas representam a média de 7 animais e a barra de erro indica o EPM (erro padrão da média). Os resultados foram avaliados utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$ .

Tabela 4.1 – Efeitos dos extratos da Bardana sobre o trato gastrointestinal.

	Anti-úlceras			Anti-secretora		Motilidade gastrointestinal	
	Lesão aguda	Lesão crônica	DPPH	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	Esvaziamento gástrico	Trânsito intestinal
EET	+	++	++	+	+	-	-
EBC	++	+	+	++	++	-	-

Nota: + : efeito esperado; - : sem efeito.

## 4.5 ATIVIDADES DAS FRAÇÕES OBTIDAS DO EXTRATO BRUTO CLOROFÓRMICO

### 4.5.1 Determinação da atividade anti-secretora ácida das frações do extrato bruto clorofórmico através de metodologia *in vitro*

A fração A do EBC na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  não alterou a atividade da bomba de prótons, mas nas concentrações de 30, 100  $\mu\text{g/mL}$  reduziu a atividade da enzima  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase de  $9,6 \pm 0,08 \mu\text{M}$  de  $\text{Pi/mg/minuto}$  no controle para  $5,0 \pm 0,1$  e  $1,0 \pm 0,03 \mu\text{M}$  de  $\text{Pi/mg/minuto}$ , respectivamente (Figura 4.24).

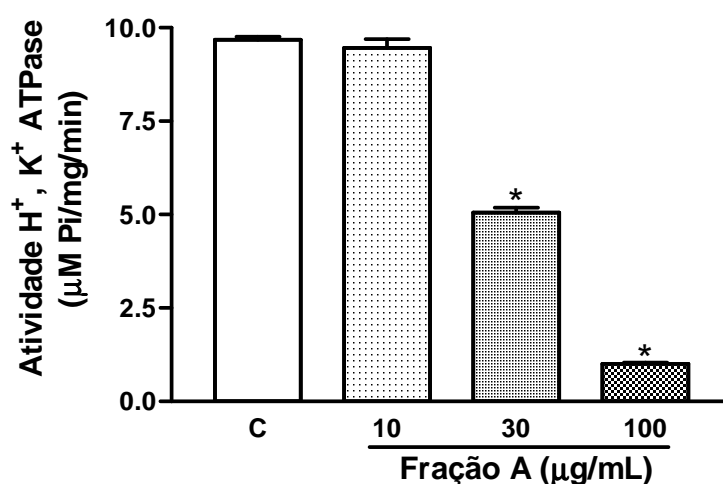


Figura 4.24: Efeito da fração A do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a atividade da  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase gástrica isolada de coelhos. C corresponde ao grupo controle. Os resultados estão expressos em  $\mu\text{M}$  de  $\text{Pi/mg/minuto}$  de atividade ATPásica. A correlação da atividade ATPásica foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$  (amostras em triplicata).

As frações B, C, D e E do EBC aplicadas nas concentrações de 0,3, 1, 3, 10 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , não foram efetivas na inibição da atividade da bomba de prótons em comparação ao grupo controle ( $9,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$  de  $\text{Pi/mg/minuto}$ ; Figura 4.25; 4.26, respectivamente).

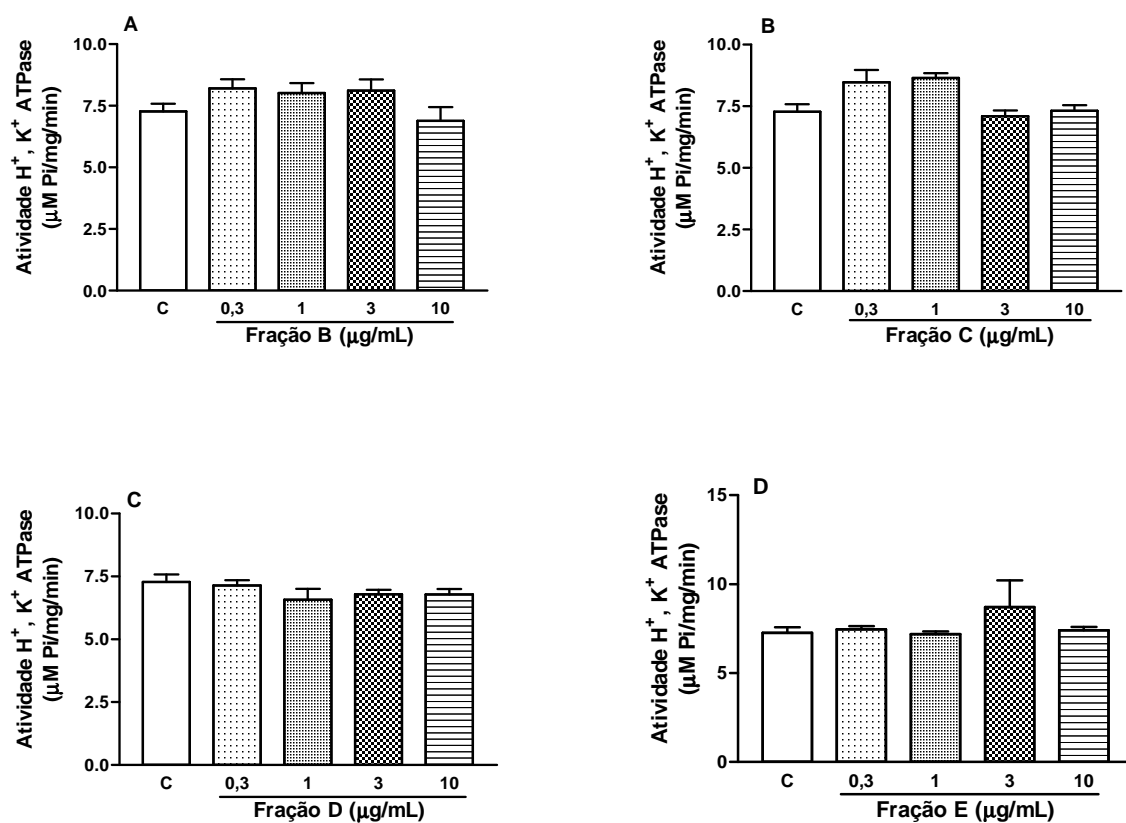


Figura 4.25: Efeito das frações B (4.28 A), C (4.28 B), D (4.28 C) e E (4.28 D) do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a atividade da H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase gástrica isolada de coelhos. O grupo C corresponde ao grupo controle. Os resultados estão expressos em µM de Pi/mg/minuto de atividade ATPásica. A correlação da atividade ATPásica foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$  (amostras em triplicata).

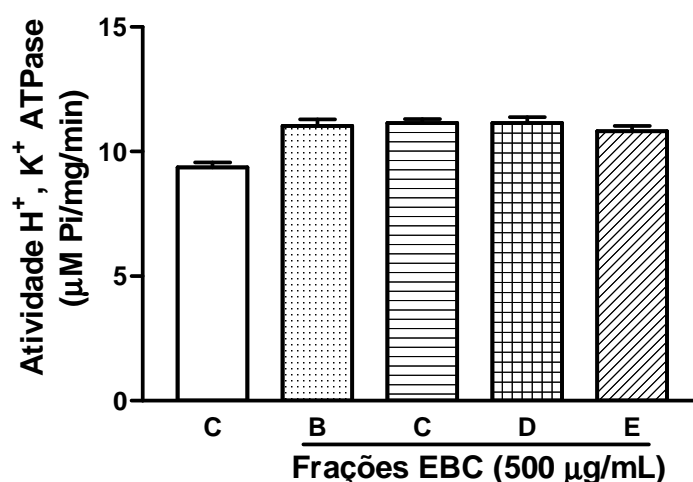


Figura 4.26: Efeito das frações B, C, D e E do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre a atividade da H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase gástrica isolada de coelhos. C corresponde ao grupo controle. Os resultados estão expressos em µM de Pi/mg/minuto de atividade ATPásica. A correlação da atividade ATPásica foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,05$  (amostras em triplicata).

#### 4.5.2 Determinação da atividade antioxidante das frações do extrato bruto clorofórmico através de metodologia *in vitro*

Como pode ser observada nas figuras 4.27, 4.28, 4.29, e 4.30 as frações A, B, C e D obtidas do EBC e utilizadas nas concentrações de 50, 100 e 250 µg/mL não foram capazes de alterar os níveis de DPPH das amostras enquanto que o ácido ascórbico (50 µg/mL) reduziu em cerca de 40 % os níveis de DPPH observados nos controles ( $0,2 \pm 0,01$  nm).

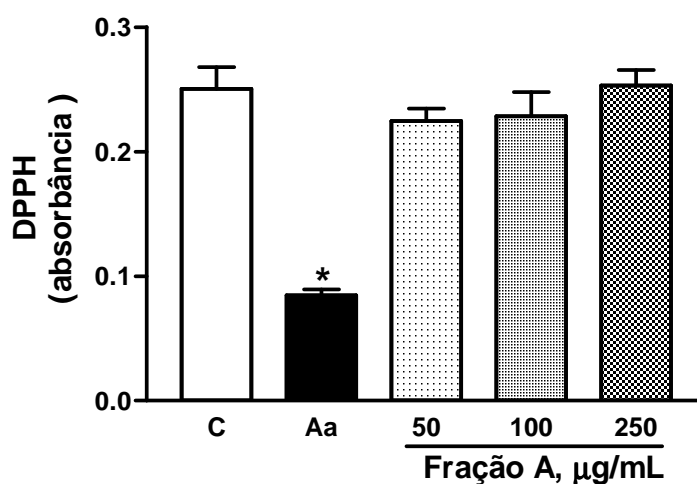


Figura 4.27: Efeito antioxidante da fração A do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o DPPH, *in vitro*. C corresponde ao grupo controle e Aa ao grupo ácido ascórbico (50 µg/mL). Os resultados estão expressos em média ± EPM (erro padrão da média) das absorbâncias. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$  (amostras em triplicata).

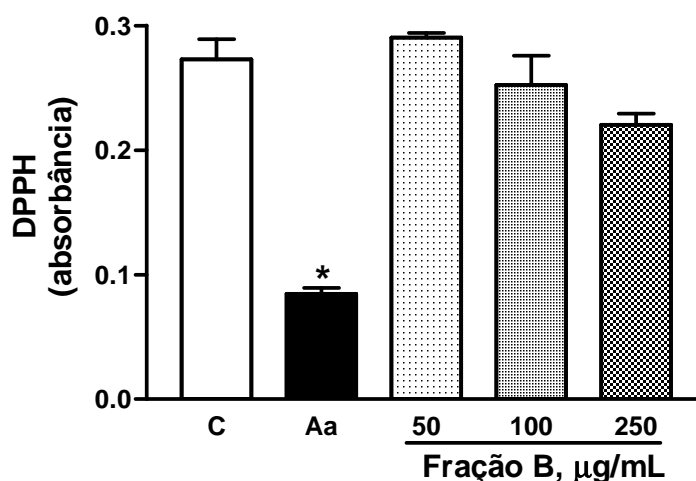


Figura 4.28: Efeito antioxidante da fração B do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o DPPH, *in vitro*. C corresponde ao grupo controle e Aa ao grupo ácido ascórbico (50 µg/mL). Os resultados estão expressos em média ± EPM (erro padrão da média) das absorbâncias. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$  (amostras em triplicata).

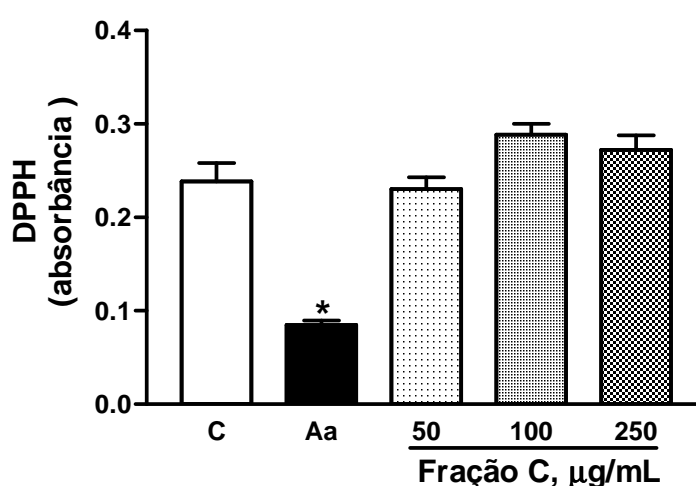


Figura 4.29: Efeito antioxidante da fração C do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o DPPH, *in vitro*. O grupo C corresponde ao grupo controle e Aa ao grupo ácido ascórbico (50 µg/mL). Os resultados estão expressos em

média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) das absorbâncias. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$  (amostras em triplicata).

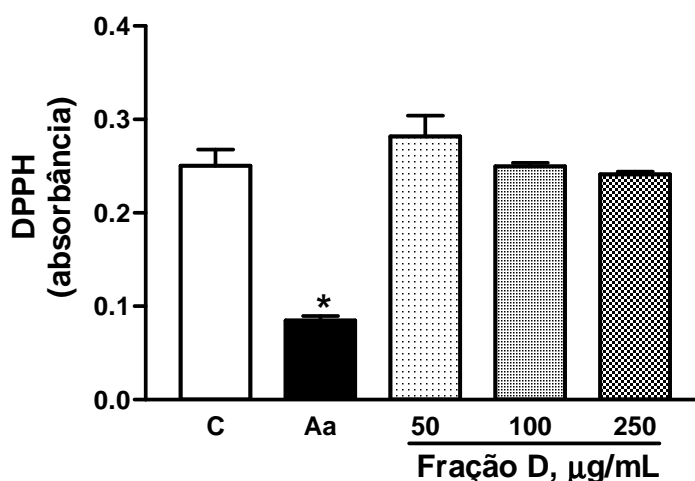


Figura 4.30: Efeito antioxidante da fração D do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o DPPH, *in vitro*. C corresponde ao grupo controle e Aa ao grupo ácido ascórbico (50 µg/mL). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) das absorbâncias. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,001$  (amostras em triplicata).

As amostras incubadas com a fração E do EBC, nas concentrações de 100 e 250 µg/mL, foram capazes de reduzir a quantidade de DPPH determinada no controle de  $0,25 \pm 0,01$  nm para  $0,16 \pm 0,005$ ;  $0,09 \pm 0,008$  nm, respectivamente (Figura 4.31).

A concentração de 50 µg/mL da fração E não foi capaz de alterar significativamente os níveis de DPPH, permanecendo semelhante ao controle (Figura 4.31).



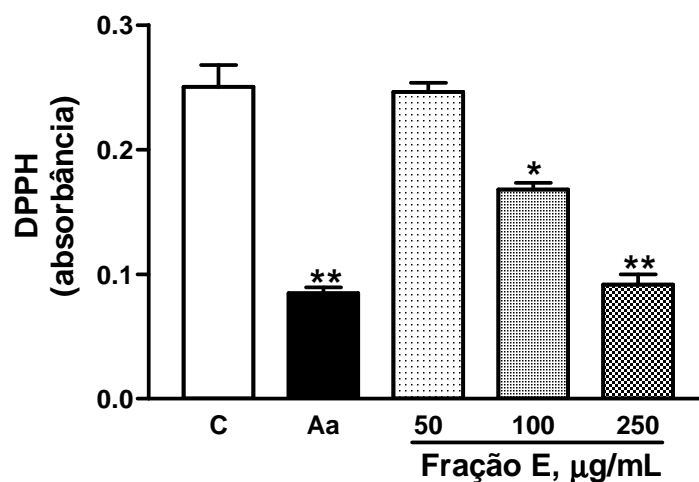


Figura 4.31: Efeito antioxidante da fração E do extrato bruto clorofórmico (EBC) das raízes de *Arctium lappa* L. sobre o DPPH, *in vitro*. C corresponde ao grupo controle e Aa ao grupo ácido ascórbico (50 µg/mL). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  EPM (erro padrão da média) das absorbâncias. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando a análise de variância entre os grupos (ANOVA de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni), (\*) considerando  $P < 0,01$  e (\*\*)  $P < 0,001$  (amostras em triplicata).

## 5 DISCUSSÃO

A *Arctium lappa* L., planta conhecida popularmente como Bardana, apresenta descrição de diversas propriedades medicinais, dentre elas as ações diurética, digestiva e antimicrobiana. No entanto, algumas destas indicações não apresentam estudos que comprovem seu efeito. Por esta razão, este trabalho objetivou embasar cientificamente as indicações terapêuticas da Bardana para o tratamento de distúrbios digestivos.

Inicialmente, realizamos alguns experimentos dando continuidade ao estudo de MENDES *et al.* (2005). A obtenção de novo extrato etanólico da Bardana foi realizada, para avaliar a perda de atividade do pó das raízes da Bardana estocado a mais de um ano no Departamento (a sua coleta foi realizada em novembro de 2003).

A avaliação farmacológica de uma nova partida do extrato bruto etanólico foi efetuada e observamos que o mesmo foi efetivo em proteger a mucosa gástrica contra as lesões induzidas pelo etanol, somente com a maior dose (1000 mg/kg, v.o.). Como MENDES *et al.* (2005) havia observado efeitos protetores também em doses menores, acreditamos que os resultados que obtivemos podem ter sofrido interferência das más condições sanitárias e de manejo dos animais no biotério da UFPR, no período de realização destes experimentos.

CALIXTO *et al.* (2003) e MENDES *et al.* (2005) descreveram a ação gastroprotetora dos extratos brutos (aquoso das folhas, e aquoso e etanólico das raízes) da Bardana. A análise destes resultados mostra que o extrato aquoso das raízes apresentou menor atividade gastroprotetora do que o etanólico das raízes e o aquoso das folhas. MENDES *et al.* (2005) caracterizou também a ação anti-secretora ácida do EBE das raízes, além da ação protetora da mucosa gástrica contra lesões produzidas pelo etanol e pelo estresse.

O modelo experimental de avaliação *in vitro* da atividade anti-secretora ácida foi realizado no presente trabalho. O efeito anti-secretor ácido exercido pelo EBE (*in vivo*) apresentado por MENDES *et al.* (2005) foi confirmado *in vitro* através da inibição da atividade da enzima  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase (figura não

apresentada). Com isso, pode-se sugerir que a inibição da atividade da bomba de prótons está envolvida de forma significativa na redução da secreção ácida gástrica, desta forma participando do efeito gastroprotetor apresentado pelo EBE observado no modelo de lesão gástrica induzida pelo etanol, pois o fator fundamental para a ocorrência da lesão gástrica é a presença de HCl (KONTUREK *et al.*, 2005).

Em março de 2006, com animais fornecidos pelo biotério da UFPR oriundos de novas matrizes, prosseguimos na avaliação do efeito gastroprotetor da Bardana. A partir de então, passamos a trabalhar com os extratos fornecidos pelo Departamento de Química da UFSC.

Para estudarmos a ação protetora gástrica do EBC (extrato bruto clorofômico) e do EET (extrato bruto etanólico, obtido do EBC por percolação), utilizamos o modelo de lesão gástrica induzido de forma aguda pela administração de etanol. Este modelo permite avaliar se o extrato estudado estimula e/ou mantém a resistência da mucosa gástrica frente às lesões produzidas por substâncias exógenas (como o etanol), mecanismo este que pode ser atribuído aos muitos fatores presentes no estômago, conhecidos como fatores protetores da mucosa gástrica (WALLACE, 2001). Estas lesões provocadas pelo etanol são lesões hemorrágicas, resultantes de danos oxidativos das células do epitélio gástrico. Estes danos levam a constrição de veias e artérias da mucosa gástrica, produzindo congestão, inflamação e lesão tecidual (REPETTO & LIESUY, 2002). A formação de lesões na mucosa por esse agente necrotizante é decorrente da redução dos mecanismos de defesa do estômago (KINOSHITA *et al.*, 1995). O EET, administrado por via oral, foi eficaz em proteger a mucosa gástrica contra as lesões induzidas pelo etanol. Assim, foi possível confirmar a gastroproteção do EBE anteriormente relatada por MENDES *et al.* (2005). O EBC também apresentou potente efeito gastroprotetor, mesmo em doses baixas, atingindo mais de 50 % de efeito protetor já com a dose de 10 mg/kg.

Para a avaliação da propriedade gastroprotetora é importante a análise do efeito cicatrizante do extrato, o que pode ser realizado através da observação de úlcera induzida de forma crônica com ácido acético 20%. Nesta metodologia,

vários mecanismos podem estar envolvidos promovendo a cicatrização de úlceras gástricas em ratos, como a estimulação da expressão do fator de crescimento epidermal (EGF) pelos nervos sensíveis a capsaicina, o aumento na produção de muco e prostaglandinas, a inibição da infiltração de neutrófilos e a peroxidação lipídica no tecido lesado (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Além disso, HAMAISHI *et al.* (2006) sugerem que, da mesma forma como é indicada a geração de ROS nas lesões gástricas induzidas pelo etanol, a geração de radicais livres pelos neutrófilos pode ser um fator determinante para a formação de úlceras crônicas induzidas pelo ácido acético. A utilização deste modelo experimental nos permitiu observar uma potente ação cicatrizante através da redução significativa das lesões gástricas tanto com o EET (em todas as doses administradas), quanto com o EBC na dose de 100 mg/kg.

Tendo em vista que os dois extratos do pó das raízes da Bardana foram efetivos em proteger a mucosa gástrica contra lesões induzidas pelo etanol e foram capazes de promover uma cicatrização mais rápida das lesões provocadas pela administração do ácido acético, passamos a analisar os mecanismos de ação envolvidos neste efeito gastroprotetor. Pretendíamos verificar a influência dos extratos sobre a preservação de fatores protetores da mucosa gástrica, tais como a GSH e o muco. Entretanto, os resultados obtidos não nos permitiram realizar esta avaliação, porque, apesar de termos repetido diversas vezes os experimentos, não conseguimos eliminar os fatores de erro da técnica utilizada.

Porém, os resultados obtidos por CALIXTO *et al.* (2003), com o extrato das folhas, e por MENDES *et al.* (2005), com o extrato das raízes, já haviam demonstrado que os extratos da Bardana são capazes de preservar os níveis de muco gástrico (via oral e intraperitoneal) e de GSH. LIN *et al.* (2000) haviam descrito que a *A. lappa* protegia hepatócitos lesados pela administração de acetaminofeno e CCl<sub>4</sub>, e que esta proteção era devido à ação antioxidante, resultante da manutenção dos níveis de GSH e citP450 hepáticos. Em 2002, LIN *et al.* voltou a observar a ação antioxidante da *A. lappa* em lesões hepáticas provocadas pelo etanol e potencializadas pelo CCl<sub>4</sub>, como consequência de uma possível ação antioxidante.

A atividade antioxidante dos extratos (EET e EBC) foi confirmada através da técnica de avaliação da taxa de seqüestro do radical livre DPPH. O poder antioxidante do EET pôde ser observado já com a concentração de 50 µg/mL, com uma taxa de seqüestro de DPPH de 60 %, e o EBC reduziu esta taxa para 54 % com a concentração de 250 µg/mL (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Percentual de efeito dos extratos das raízes da Bardana na atividade antioxidante.

DPPH	
EET (µg/mL)	(%)
1	0
10	37,5
50	60
100	67
500	68
EBC (µg/mL)	
50	21
100	25
250	54

Como não obtivemos resultados conclusivos que permitissem avaliar a atividade da mieloperoxidase das mucosas gástricas lesadas cronicamente com ácido acético, não pudemos analisar a capacidade inibidora da migração de neutrófilos para o local da lesão. Porém, os resultados vistos até aqui permitem sugerir que a atividade antioxidante parece ser um importante mecanismo de ação envolvido no efeito gastroprotetor dos extratos do pó das raízes da Bardana (EET e EBC). Esta ação antioxidante pode ser decorrente da manutenção dos níveis de GSH e muco (CALIXTO *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 2005), considerando que o muco também é capaz de atuar como antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica e outros processos mediados por radicais livres, que contribuem para os danos da mucosa gástrica (REPETTO & LIESUY, 2002), além de atuar como uma barreira física natural. Neste caso, o muco poderia atuar protegendo a mucosa da ação de radicais livres e do próprio ácido gástrico, pois o contato da mucosa com estes fatores lesivos impediria/retardaria a sua normal capacidade regenerativa.

O possível efeito gastroprotetor da Bardana como consequência de uma ação física, como uma barreira protetora sobre a mucosa, foi descartado por MENDES *et al.* (2005), que demonstrou a manutenção dos níveis de muco mesmo após administração intraperitoneal do extrato bruto etanólico.

Para esclarecermos outras vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito protetor gástrico do EET da Bardana, utilizamos a técnica *in vivo* de avaliação da atividade anti-secretora ácida (ligadura pilórica). Esta técnica possibilita observar a influência do extrato testado sobre a taxa de secreção ácida gástrica. Esse é um parâmetro cujo aumento pode causar ulceração na mucosa por reduzir os fatores protetores e lesar diretamente as células da mucosa do estômago, e que, quando inibido, favorece a restauração da mucosa lesada (JAINU e DEVI, 2006). Também foi utilizada a técnica *in vitro* de determinação da atividade da bomba de prótons ( $H^+$ ,  $K^+$  ATPase), que permite detectar a atividade secretora de HCl da célula parietal da mucosa gástrica pela enzima  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase (JAINU e DEVI, 2006).

A associação dos resultados obtidos nos estudos *in vivo*, onde constatamos a presença do efeito do extrato em reduzir a secreção ácida gástrica e dos estudos *in vitro*, onde comprovamos a presença do efeito inibidor da enzima  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase, permite-nos sugerir que, na atividade gastroprotetora dos princípios ativos presentes no extrato etanólico das raízes da Bardana, além da ação antioxidante, o seu mecanismo de ação também envolve o importante efeito anti-secretor ácido. Sua potencialidade em inibir a secreção ácida gástrica reside na sua capacidade de reduzir a atividade da bomba de prótons na célula parietal, que é a etapa final da secreção ácida gástrica e o principal alvo para a ação de medicamentos (NISHIOKA *et al.*, 1999). A ação anti-secretora do EET também pode ser decorrente da sua ação sobre o SNC. Há pesquisas que demonstram um aumento da secreção ácida gástrica pela ação do GABA sobre seus receptores  $GABA_A$  e que o uso de antagonistas  $GABA_A$  e agonistas  $GABA_B$  foram capazes de reduzir a incidência de úlceras (TSAI, 2005). Como SBOLLI (2003) havia relatado a possível participação do sistema gabaérgico no efeito depressor do extrato etanólico da Bardana, podemos sugerir que o EET possua algum princípio ativo que atue sobre o receptor  $GABA_B$ . Além disso, MENDES *et al.* (2005) também

havia sugerido a participação do SNC na ação gastroprotetora da Bardana na proteção da mucosa gástrica contra as lesões induzidas por estresse, onde o SNC tem participação decisiva.

A ação do EBC sobre a secreção ácida gástrica também foi estudada nos modelos de ligadura do piloro (*in vivo*) e inibição da bomba de prótons (*in vitro*). As figuras 4.10 e 4.11 mostram um efeito redutor da acidez da secreção ácida (em todas as doses) e do volume secretado (maior dose), quando o EBC foi administrado pela via intraduodenal. Para confirmar o mecanismo pelo qual esta inibição ocorreu, foi realizado o teste sobre a atividade da bomba de prótons. A atividade do EBC sobre a bomba de prótons foi bastante efetiva, mesmo nas doses baixas, caracterizando um efeito significativo a partir da concentração de 30 µg/mL e atingindo uma inibição da bomba em mais de 50 % na concentração de 100 µg/mL (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Percentual de efeito dos extratos das raízes da Bardana na inibição da atividade da bomba de prótons.

		Inibição da H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ATPase
EET (µg/mL)		(%)
	10	6
	100	9
	1000	32
EBC (µg/mL)		
	10	13
	30	23
	100	73
	300	94

Entretanto, o EBC que foi um potente inibidor *in vitro* da bomba de prótons, só foi efetivo em reduzir a secreção ácida gástrica *in vivo* quando administrado por via intraperitoneal (Tabela 5.3). Esse resultado sugere que os princípios ativos presentes neste extrato podem ser inativados no pH ácido gástrico, podem sofrer metabolização hepática e/ou outras interferências, reduzindo assim a sua biodisponibilidade efetiva.

Esse efeito anti-secretor dos extratos da Bardana pode também ser decorrente da capacidade inibidora da replicação viral de alguns compostos presentes, como a arctigenina e a baicalina, considerando que este efeito é resultante de uma inibição da síntese protéica. Ora, a inibição da síntese protéica pode refletir não somente sobre partículas virais, mas também sobre células do hospedeiro, influenciando sobre a produção de hormônios gastrointestinais, como por exemplo, a gastrina. Ao inibir a produção de gastrina, o extrato indiretamente inibe o seu estímulo sobre a secreção ácida da célula parietal gástrica.

Tabela 5.3 – Percentual de efeito dos extratos das raízes da Bardana na inibição da acidez do conteúdo gástrico.

<b>Acidez gástrica</b>	
<b>EET (via id - mg/kg)</b>	<b>(%)</b>
100	43
300	14
1000	14
<b>EBC (via id - mg/kg)</b>	
100	22
300	22
600	33
<b>EBC (via ip - mg/kg)</b>	
10	50
30	60
100	67

Para avaliar a participação da via colinérgica no mecanismo de ação gastroprotetor dos extratos da Bardana utilizamos o modelo experimental que determina a taxa de trânsito intestinal e o esvaziamento gástrico. Neste modelo experimental, a taxa de esvaziamento gástrico está relacionada ao mecanismo neurohumoral, o qual depende de uma inervação vagal intacta. Com isso, os neurônios mioentéricos da parede gástrica sofrem a ação de vários neurotransmissores, dentre eles a Ach. Os neurônios excitatórios contêm Ach e/ou substância P, os quais se projetam diretamente para a camada de músculo circular, promovendo a contração. A Ach é descrita como o maior regulador da motilidade intestinal, atuando através dos receptores muscarínicos M<sub>1</sub> e M<sub>3</sub>.



(Revisado por HANSEN, 2003). O EET e o EBC não apresentaram qualquer influência sobre a motilidade gastrointestinal. Como os extratos não alteraram a taxa de esvaziamento gástrico e de trânsito intestinal, sugerimos que a via colinérgica não tem participação importante no mecanismo de ação gastroprotetor destes extratos nestas doses testadas.

Além de demonstrar o efeito e estudar os mecanismos de ação envolvidos, nosso objetivo também era prosseguir os estudos com frações purificadas da Bardana. Para isto, era necessário fazermos a comparação da potência do efeito de extratos obtidos com diferentes solventes para indicarmos qual deles deveria ser fracionado quimicamente. Apesar de o EBC conseguir atingir 50 % de proteção contra úlceras induzidas por etanol com dose 10 vezes menor (30 mg/kg) do que o EET (300 mg/kg), este último em doses menores apresentou maior potência, pois 100 mg/kg do EET protegeu 90 %, enquanto que dose semelhante de EBC protegeu 79 %. Analisando apenas este resultado não podemos indicar qual dos extratos é o mais efetivo (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Percentual de proteção dos extratos das raízes da Bardana nas lesões induzidas de forma aguda e crônica.

Etanol		Crônico	
EET (mg/kg)	(%)	EET (mg/kg)	(%)
100	90	10	79
300	56	30	65
1000	59	100	56
EBC (mg/kg)		EBC (mg/kg)	
10	62	10	35
30	59	30	46
100	76	100	52
100	79		-
300	85		-
1000	99		-

De maneira semelhante ambos os extratos alcançaram cerca de 50 % de proteção contra lesões crônicas induzidas pelo ácido acético com doses equivalentes. Porém, o EET na dose de 10 mg/kg foi capaz de proteger 79 %, enquanto que a mesma dose do EBC só conseguiu proteger 35 % (Tabela 5.4).

Quando avaliada a atividade antioxidante por meio da quantificação de DPPH, o EET se mostrou mais efetivo porque atingiu 60 % de atividade antioxidante com a concentração de 50 µg/mL, enquanto que o EBC nesta concentração só consegue obter 21 %. Para atingir 54 % de atividade antioxidante o EBC precisou ser adicionado na concentração de 250 µg/mL (Tabela 5.1).

A secreção ácida gástrica foi reduzida com a dose de 100 mg/mL do EET, enquanto que a mesma dose do EBC por via intraduodenal não foi efetiva. O EBC inibiu a secreção ácida gástrica em percentual semelhante ao do EET com dose 6 vezes maior. Porém, quando o EBC foi administrado por via intraperitoneal, mostrou-se mais potente do que administrado por via intraduodenal (Tabela 5.3). O EBC foi cerca de 8 vezes mais potente para inibir a atividade da bomba de prótons do que o EET quando testados na concentração de 100 µg/mL (Tabela 5.2). Com isso, o EBC se caracteriza como mais potente que o EET na atividade anti-secretora (*in vivo* e *in vitro*).

Na comparação de todas as atividades testadas observamos que os dois extratos, EET e EBC, apresentam perfil de ação diferente, sendo que o EET em doses menores mostra efeitos mais potentes, enquanto que o EBC na maioria das vezes tende a obedecer a dinâmica de atingir maiores efeitos com doses maiores. Como o efeito protetor contra as lesões induzidas pelo etanol foi muito mais evidente com o EBC, optamos por dar continuidade aos estudos com este extrato.

Muitos compostos presentes na Bardana já foram isolados e identificados, incluindo o ácido caféico, o ácido clorogênico e os flavonóides. Dentre os efeitos do ácido caféico, está descrito o seu potente poder antioxidante, seqüestrador de radicais livres (MAHAKUNAKORN *et al.*, 2004; ZAYACHKIVSKA *et al.*, 2005; KANG *et al.*, 2006) e por efeito indireto, induzindo enzimas antioxidantes como a catalase (KANG *et al.*, 2006). O ácido clorogênico também apresenta efeitos antioxidantes. Há estudos que conferem à ação seqüestradora de radicais livres do ácido clorogênico a mais importante atividade biológica da Bardana (CHEN *et al.*, 2004). Já, os flavonóides podem ser responsáveis por ações anti-inflamatórias, pela supressão de neutrófilos/cascata de citocinas no TGI, ações antioxidantes e seqüestrador de radicais livres (ZAYACHKIVSKA *et al.*, 2005), além de aumentar

o conteúdo de muco e de PG na mucosa gástrica (REPETTO & LIESUY, 2002). ZAYACHKIVSKA *et al.* (2005) também citam como efeito dos flavonóides a evolução do processo de cicatrização de úlceras.

Assim, foram obtidas cinco frações do extrato clorofórmico. Destas, somente a fração A apresentou efeito equivalente ao do EBC no teste da inibição da atividade da  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase. As demais frações não apresentaram efeito sobre a atividade da bomba de prótons. Como a fração A é considerada uma fração menos purificada quimicamente, com uma mistura de princípios ativos, a presença dessa mistura de compostos pode explicar a sua ação em detrimento das outras frações, que foram caracterizadas quimicamente como mais puras. Corroborando esta hipótese, FONTE (2004) já fazia referência a diversas pesquisas que comprovam que a mistura de compostos aumenta a ação farmacológica, quando comparados à soma das atividades de cada composto isolado.

Entretanto, na avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das frações do EBC, somente a fração E apresentou efeito antioxidante sobre o radical livre DPPH. As demais frações (A, B, C e D) não foram capazes de causar qualquer efeito como seqüestrador do radical DPPH. Estas informações sugerem que nos extratos da Bardana podem estar presentes o ácido caféico e flavonóides, pois efeitos semelhantes aos descritos para estes produtos foram observados com a aplicação dos extratos, que protegeram contra as lesões induzidas pelo etanol, mostraram-se eficientes no processo de reparação da mucosa lesada pelo ácido acético e reduziram a secreção ácida gástrica por inibir a atividade da bomba de prótons na célula parietal.

Desta forma, podemos concluir que os dois extratos da raiz (etanólico e clorofórmico) são efetivos gastroprotetores, com perfis de ação diferentes que indicam a presença e/ou concentração diferente de princípios ativos. Assim sendo, o EET parece exercer a sua ação, principalmente, por seus efeitos antioxidante e inibidor de bomba de prótons. Já o EBC, mais potente na gastro proteção, parece possuir uma atividade antioxidante majoritária (demonstrada também na fração E). A potente atividade anti-secretora do EBC só foi demonstrada *in vitro* (também com a fração A) e *in vivo* quando administrada por via intraperitoneal. Com isso,

sugere-se que, se a via de administração é importante para o seu efeito, os princípios ativos inibidores da bomba de prótons deverão receber formulação capaz de protegê-los contra sua inativação.

## 6 CONCLUSÕES

Conforme os resultados apresentados, conclui-se que ambos os extratos da Bardana, EET e EBC, demonstraram efeitos gastroprotetores na lesão aguda induzida pelo etanol e na lesão crônica induzida pelo ácido acético. Ao comparar-se a atividade dos dois extratos, o EBC foi mais efetivo na proteção da mucosa lesionada pelo etanol, enquanto que o EET apresentou uma ação cicatrizante mais evidente.

Na avaliação da atividade antioxidante dos extratos, observou-se que os dois extratos têm ação seqüestradora sobre o DPPH, sendo que o EET foi mais potente que o EBC.

A atividade anti-secretora gástrica do EET foi caracterizada *in vivo* e *in vitro*. Já, o EBC apresentou uma atividade anti-secretora *in vivo* discreta, quando comparada a inibição da atividade da  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase (*in vitro*). Quando o EBC foi administrado pela via intraperitoneal, o potente efeito anti-secretor observado *in vitro* também se caracterizou *in vivo*. Ao se avaliar a atividade dos dois extratos, foi possível concluir que o EBC apresentou uma ação anti-secretora gástrica mais potente que a do EET.

Ao se observar a ausência de efeito dos extratos etanólico e clorofórmico sobre a motilidade gastrointestinal, conclui-se que a via colinérgica não está envolvida de forma significativa no mecanismo de ação gastroprotetor dos extratos da Bardana.

De acordo com os resultado obtidos na avaliação dos extratos etanólico e clorofórmico, considerou-se o extrato clorofórmico como mais eficaz na gastroproteção e, assim, foi realizado o fracionamento deste extrato. Dentre as cinco frações obtidas, a fração A apresentou efeito anti-secretor *in vitro* equivalente ao observado com o EBC. Já, a fração E foi a fração que apresentou efeito antioxidante sobre o DPPH.

Assim, conclui-se que o efeito gastroprotetor do EET foi decorrente da sua potente atividade antioxidante e de seu efeito anti-secretor gástrico, e que o efeito gastroprotetor do EBC foi consequência de sua ação antioxidante. Porém, não se

exclui outros fatores envolvidos no amplo processo de gastroproteção como NO, infiltração celular, fatores de crescimento, entre outros não avaliados neste trabalho.

No estudo das frações do EBC, observou-se que a fração A foi a responsável pela ação inibidora da  $H^+$ ,  $K^+$  ATPase e a fração E foi a fração determinante para a ação antioxidante do EBC.

A soma dos resultados obtidos indica que os dois extratos testados apresentam efeito gastroprotetor, o que justifica a continuidade dos estudos com a Bardana, pois esta planta tem potencial para ser validada cientificamente, podendo assim apresentar uma maior utilidade pela população.

## 7 REFERÊNCIAS

ABITOL, R. A. **Doença ulcerosa péptica**. In: Medstudents: Rotinas de Clínica Médica. Disponível em: <http://www.medstudents.com.br/rotinas/clinmed/dup.htm>. Acesso em 24/11/06.

ADAMI, M.; FRATI, P.; BERTINI, S.; KULKARNI-NARLA, A.; BROWN, D. R.; CARO, G.; CORUZZI, G.; SOLDANI, G. Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1598 - 1606, 2002.

AIHARA, T.; FUJISHITA, T.; KANATANI, K.; FURUTANI, K.; NAKAMURA, E.; TAKETO, M. M.; MATSUI, M.; CHEN, D.; OKABE, S. Impaired Gastric Secretion and Lack of Trophic Responses to Hypergastrinemia in M3 Muscarinic Receptor Knockout Mice. **Gastroenterology**, v. 125, p. 1774–1784, 2003.

AIHARA, T.; NAKAMURA, Y.; TAKETO, M. M.; MATSUI, M.; OKABE, S. Cholinergically stimulated gastric acid secretion is mediated by M3 and M5 but not M1 muscarinic acetylcholine receptors in mice. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 288, p. 1199–1207, 2005.

BARROS, D. **Fitomedicamentos na indústria brasileira**. Phytomédica, ano 1, v. 1. Disponível no endereço: [http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica\\_jornal/numero5.pdf](http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero5.pdf). Acesso em 24/11/2006.

BAYIR, Y.; ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; ASLAN, A.; SULEYMAN, H.; HALICI, M.; KAZAZ, C. The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. **Phytomedicine**, v. 13, p. 584–590, 2006.

BLOIS, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199 – 1200, 1958.

BRITO, A.R.M.S. How to study pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **Journal of Ethno-pharmacology**, v. 54, p. 131-138, 1996.

CALIXTO, C.P.; FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A. **Atividade antiulcerogênica do extrato aquoso bruto das folhas da *Arctium lappa* L.(EA)**. In: XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia, 2003, Águas de Lindóia, SBFTE 2003, Resumos, p.187-188.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, vol.55, no.3, p.37-39, 2003.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1 ed. Chapecó: Argos, 2001.

CASTRO, J.L. **Medicina Vegetal**, 2 ed. Publicações Europa-América, p. 134-135, 1981.

CHAPADEIRO, E.; LOPES, E. R.; RASO, P.; TAFURI, W. L. **Bogliolo PATOLOGIA**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

CHEN, F. A.; WU, A. B.; CHEN, C. Y. The influence of treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its active. **Food Chemistry**, v. 86, p. 479-484, 2004.

CHO, M. K.; JANG, Y. P.; KIM, Y. C.; KIM, S. G. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF- $\alpha$  inhibition. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 1419-1429, 2004.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1996.

CORRÊA JÚNIOR, C.; SCHEFFER, M. C. Produção de plantas medicinais, condimentares e aromáticas no Estado do Paraná. In: CORREA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCHEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectiva**. 1 ed. Curitiba: EMATER, 2004.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis no Brasil**. Ministério da Agricultura: Instituto de Desenvolvimento Florestal, v.I, p. 269, 1984.

COSTA, M. **Identificação e farmacologia geral da substância tóxica isolada da *Arctium lappa* L. (Asteraceae)**. São Paulo, 1991, Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Neurotransmissores, Departamento de Farmacologia, Escola Paulista de Medicina.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. 1 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

CZESNIKIEWICZ-GUZIŁ, M.; BIELANSKI, W; GUZIŁ, T.J.; LOSTER, B.; KONTUREK, S.J. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and its implications in gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 56, Supp 6, p. 77-89, 2005.



DI STASI, L. C. Conceitos básicos na pesquisa de plantas medicinais. In: **Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar**. Editora UNESP, 1996.

DOMER, F.R. **Animail experiments in pharmacological analysis**. Charles C. Thomas Publisher, 1971, 669p.

EICH, E.; PERTZ, H.; KALOGA, M.; SCHULZ, J.; FESEN, M.R.; MAZUMDER, A.; POMMIER, Y.(-)-Arctigenin as a lead structure for inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. **J Med Chem.**, v. 39 (1), p. 86-95, 1996.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colrimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, v. 66, p. 375-400, 1925.

FONTE, N. N. A complexidade das plantas medicinais: enfoque farmacêutico. In: CORREA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCHEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectiva**. 1 ed. Curitiba: EMATER, 2004.

FONTE, N. N. Transformação de plantas medicinais no estado do Paraná e considerações sobre alguns aspectos legais e institucionais e seus reflexos na produção e consumo. In: CORREA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCHEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectiva**. 1 ed. Curitiba: EMATER, 2004.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales. El Discórides renovado**. 11 ed. Barcelona: Labor S.A., 1988.

FORNAI, M.; NATALE, G.; COLUCCI, R.; TUCCORI, M.; CARAZZINA, G.; ANTONIOLI, L.; BALDI, S.; LUBRANO, V.; ABRAMO, A.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of protection by pantoprazole against NSAID-induced gastric mucosal damage. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 372, p. 79–87, 2005.

FOX, J.G.; WANG, T.C. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 18, p.15–25, 2002.

FRIIS–HANSEN, L.; RIENECK, K.; NILSSON, H.; WADSTRÖM, T.; REHFELD, J. F. Gastric Inflammation, Metaplasia, and Tumor Development in Gastrin–Deficient Mice. **Gastroenterology**, v. 131, p. 246–258, 2006.

GANOG, W.F. **Review of medical physiology**. 21 ed. San Francisco: Lange Medical Books, 2003.

GENTIL, M.; PEREIRA, J. V.; SOUSA, Y. T. C. S.; PIETRO, R.; NETO, M. D. S. ; VANSAN, L. P.; FRANÇA, S. C. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of

*Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings **Phytotherapy Research**, v 20, n. 3, p. 184-186, 2006.

GRAÇA, C.. 13 anos de fitoterapia em Curitiba In: CORREA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCHEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectiva**. 1 ed. Curitiba: EMATER, 2004.

GREGÓRIO, G. **Nova legislação de fitomedicamentos inclui plantas brasileiras**. Phytomédica, ano 1, v. 1. Acesso em 24/11/2006. Disponível no endereço: [http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica\\_jornal/numero5.pdf](http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero5.pdf).

GUIMARÃES, M. M.; RIECK, L.; SILVA-SANTOS, J.E.; MESIA-VELA, S.; MARQUES, M.C.A. Pesquisas realizadas com plantas medicinais no estado do Paraná no período de 1992 a 2002. In: CORREA JR, C.; GRAÇA, L.R.; SCHEFFER, M.C. **Complexo Agroindustrial das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares no Estado do Paraná – Diagnóstico e Perspectiva**. 1 ed. Curitiba: EMATER, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Textbook of medical physiology**. 11 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.

HAMAISHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Anti-ulcer Effect of Tea Catechin in Rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29 (11), p. 2206—2213, 2006.

HANSEN, M. B. Neurohumoral Control of Gastrointestinal Motility. **Physiol. Res.** v. 52, p. 1-30, 2003.

HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **TiPS**, v. 20, p. 196-198, 1999.

HILL, M. The microbiology of *Helicobacter pylori*. **Biomed & Pharmacother**, v. 51, p. 161-163, 1991.

HIRSCH, A. B.; ROBERT, B.; MCCUEN, R. W.; ARIMURA, A.; SCHUBERT, M. L. Adrenomedullin stimulates somatostatin and thus inhibits histamine and acid secretion in the fundus of the stomach. **Regulatory Peptides**, v. 110, p. 189– 195, 2003.

HOLZER, P. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 16, p. 469–478, 2000.

HOOGERWERF, W.; PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidz gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**, Joel Hardman e Lee E. Limbird, 10 ed. , Rio de Janeiro, 2003.

HORN, J. The Proton-Pump Inhibitors: Similarities and Differences. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 3, 2000.

HOU, W.; SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, p. 593–598, 2006.

JAINU, M.; SRINIVASULU, C.; DEVI, S. Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 156–163, 2006.

KAGAWA, S.; AOI, M.; KUBO, Y.; KOTANI, T.; TAKEUCHI, K. Stimulation by Capsaicin of Duodenal HCO<sub>3</sub> Secretion via Afferent Neurons and Vanilloid Receptors in Rats Comparison with Acid-Induced HCO<sub>3</sub> Response. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 48, n. 9, p. 1850–1856, 2003.

KARDOSOVA, A.; EBRINGEROVÁ, A.; ALFÖLDI, J.; NOSÁL'OVÁ, G.; FRANOVÁ, S.; HRIBALOVÁ, V. A biologically active fructan from the roots of *Arctium lappa* L., var. *Herkules*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, p. 135-140, 2003.

KINOSHITA, M.; KUME, E.; TAMAKI, H. Roles of prostaglandins, nitric oxide and the capsaicin-sensitive sensory nerves in gastroprotection produced by ecabet sodium. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V.275, p. 494–501, 1995.

KITAMURA, K.; HONDA, M.; YOSHIKAWA, H.; YAMAMOTO, S.; NAKANE, H.; FUKUSHIMA, M.; ONO, K.; TOKUNAGA, T. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro*. **Antiviral Res.**, v. 37 (2), p. 131-40, 1998.

KOMASAKA, M.; HORIE, S.; WATANABE, K.; MURAYAMA, T. Antisecretory effect of somatostatin on gastric acid via inhibition of histamine release in isolated mouse stomach. **European Journal of Pharmacology**, v.452, p. 235– 243, 2002.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, J.W.; PAWLIK, W.W. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; nobel prize for achievements in gastrology during last century. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 56 (4), p. 507-530, 2005.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; PAWLIK, T.; SLIWOWSKI, Z.; OCHMAŃSKI, W.; HAHN, E.G. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 55, p. 5-17, 2004.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; KONTUREK, J.W.; PLONKA, M.; CZESNIKIEWICZ-GUZIŁ, M.; BRZOZOWSKI, T.; BIELANSKI, W. *Helicobacter*

*pylori* and its involvement in gastritis and peptic ulcer formation. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 57, Supp 3, p. 29-50, 2006.

KUBO, K.; UEHARA, H.; KUBOTA, T.; NOZU, T.; MORUYA, M.; WATANABE, Y.; SHOJI, E.; SANTOS, S. B.; HARADA, K.; KONGO, Y. Effects of ranitidine on gastric vesicles containing  $H^+$ ,  $K^+$  - ATPase adenosine triphosphatase in rats. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 30, p. 944-951, 1995.

KURTEL, H.; GHANDOUR, S. Endothelins and inflammation: the gastrointestinal system. **Pathophysiology**, v. 6, p. 77–89, 1999.

LEONARD, S.S. ; KEIL, D.; MEHLMAN, T.; PROPER, S.; SHI, X.; HARRIS, G.K. Essiac tea: scavenging of reactive oxygen species and effects on DNA damage. **J Ethnopharmacol.**, v. 103 (2), p. 288-96, 2006.

LI, B.Q.; FU, T.; YAN, Y.D.; BAYLOR, N.W.; RUSCETTI, F.W.; KUNG, H.F. Inhibition of HIV infection by baicalin--a flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. **Cell Mol Biol Res.**, v. 39 (2), p. 119-24, 1993.

LIN, C.C.; LU, J.M.; YANG, J.J.; CHUANG, S.C.; UJIE, T. Anti-inflammatory and radical scavenge effects of *Arctium lappa*. **Am J Chin Med.**, v. 24 (2), p. 127 – 37, 1996.

LIN, S.C.; CHUNG, T.C.; LIN, C.C.; UENG, T.H.; LIN, Y.H.; LIN, S.Y.; WANG, L.Y. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride- and acetaminophen-induced liver damage. **Am J Chin Med.**, v. 28 (2), p. 163 – 73, 2000.

LIN, S.C.; LIN, C.H.; LIN, C.C.; LIN, Y.H.; CHEN, C.F.; CHEN, I.C.; WANG, L.Y. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* Linne on liver injuries induced by chronic ethanol consumption and potentiated by carbon tetrachloride. **J Biomed Sci.**, v. 9 (5), p. 401- 9, 2002.

MAITY, P.; BISWAS, K.; ROY, S.; BANERJEE, R.K.; BANDYOPADHYAY, U. Smoking and the pathogenesis of gastroduodenal ulcer – recent mechanistic update. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 329–338, 2003.

MANUAL MERCK. **Biologia do sistema digestivo**. In: Distúrbios Digestivos. Disponível em: [http://www.msd-brazil.com/msd43/m\\_manual/mm\\_sec9\\_99.htm](http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec9_99.htm). Acesso em 24/11/06.

MENDES, D. A. G. B; OTOFUJI, G. M.; MASUDA, E. T.; VELA, S. M.; MARQUES, M.C.A. **Efeito protetor gástrico do extrato bruto aquoso e etanólico das raízes de *Arctium lappa* L. (Bardana)**. FESBE 2005, Resumos, p. 96, Águas de Lindóia, São Paulo, 2005.

MINOWA, S.; TSUCHIYA, S.; SOMEYA, A.; HORIE, S.; MURAYAMA, T. Role of neuropeptide receptor systems in vanilloid VR1 receptor-mediated gastric acid secretion in rat brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 486, p. 317– 324, 2004.

MOREAU, M.; DAMINET, S.; MARTEL-PELLETIER, J.; FERNANDES, J.; PELLETIER, J.P. Superiority of the gastroduodenal safety profile of licofelone over rofecoxib, a COX-2 selective inhibitor, in dogs. **J. vet. Pharmacol. Therap.**, v. 28, p. 81–86, 2005.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. 8 ed. São Paulo: Hemus, 1997.

MORITA, K. ; KADA, T. ; NAMIKI, M. A desmutagenic factor isolated from burdock (*Arctium lappa* Linne). **Mutat Res.**, v. 129 (1), p. 25-31, 1984.

MURAKAMI, S.; ARAI, L.; MURAMATSU, M.; OTOMO, S.; BABA, K.; KIDO, T.; KOZAWA, M. Inhibition of gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase and acid secretion by cassigarol A, a polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. **Biochem. Pharmacol.**, v. 44, p. 33-37, 1992.

NATALE, G.; LAZZERI, G.; LUBRANO, V.; COLUCCI, R.; VASSALLE, C.; FORNAI, M.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Mechanisms of gastroprotection by lansoprazole pretreatment against experimentally induced injury in rats: role of mucosal oxidative damage and sulfhydryl compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.195, p. 62– 72, 2004.

NISHIO, H.; HAYASHI, Y.; TERASHIMA, S.; TAKEUCHI, K. Role of endogenous nitric oxide in mucosal defense of inflamed rat stomach following iodoacetamide treatment. **Life Sciences**, v. 79, p. 1523–1530, 2006.

NISHIOKA, K.; NAGAO, T.;TETSURO URUSHIDANI. Correlation between Acid Secretion and Proton Pump Activity during Inhibition by the Proton Pump Inhibitors Omeprazole and Pantoprazole. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 1349– 1359, 1999.

OCHI, Y.; HORIE, S.; MARUYAMA, T.; WATANABE, K.; YANO, S. Necessity of intracellular cyclic AMP in inducing gastric acid secretion via muscarinic M3 and cholecystinin2 receptors on parietal cells in isolated mouse stomach. **Life Sciences**, v. 77, p. 2040–2050, 2005.

PEREIRA, J. V. ; BERGAMO, D. C. B.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. ; C PIETRO, R.; SOUSA, Y. T. C. S. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. **Braz. Dent. J.**, v. 16, n. 3, p. 192-196, 2005.

PHILLIPSON, M.; ATUMA, C.; HENRIKSNA S, J.; HOLM, L. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 282, p. G211–G219, 2002.

PRINZ, C.; ZANNER, R.; GRATZL, M. Physiology of gastric Enterochromaffin-like cells. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 65, p. 371–82, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**, 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

REPETTO, M.G.; LIESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J. E.; LANCASTER, C. & HAUCHAR, A. J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 364-369, 2001.

RODRIGUEZ, J.A.; ASTUDILLO, L.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 291–294, 2003.

RODRIGUEZ, P.; BLANCO, J.; JUSTE, S. Allergic contact dermatitis due to burdock. **Contact Dermatitis** v. 33, p. 134–135, 1995.

SASAKI, Y.; KIMURA, Y.; TSUNODA, T.; TAGAMI, H. Anaphylaxis due to burdock. **International Journal of Dermatology** , v. 42, p. 472–473, 2003.

SBOLLI, K. C. **Arctium lappa: Efeitos depressores do sistema nervosa central em roedores**. Curitiba, 2003. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SCARPIGNATO, S.; CAPOVILLA, T.; BERTACCINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of conscious rat. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 246, p. 286-294, 1980.

SCHIRODER, H.C.; MERZ, H.; STEFFEN, R.; MULLER, W.E.; SARIN, P.S.; TRUM, M.S.; SCHULZ, J.; EICH, E. Differential *in vitro* anti-HIV activity of natural lignans, **Z Naturforsch**, v. 45, p. 1215-21., 1990.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 18, p. 639–649, 2002.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 20, p. 519–525, 2004.

SHAY, H.; KOMAROV, S. A.; FELS, S. S.; MERANZE, D.; GRUENSTEIN, M. & SIPLET, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**, v. 5, p. 43-61, 1945.

STICKNEY, J.C.; NORTHUP, D.W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine in rat. **Exp. Boil. Med.**, v. 101, p. 582, 1959.

SUGAMOTO, S.; KAWAUCH, S.; FURUKAWA, O.; MIMAKI, H.; TAKEUCHI, K. Role of Endogenous Nitric Oxide and Prostaglandin in Duodenal Bicarbonate Response Induced by Mucosal Acidification in Rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, n. 6, p. 1208–1216, 2001.

TAKAGI, E.; OKABE, S. e SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on healing. **Japan. J. Pharmacol.**, v. 19, p. 416-426, 1969.

TSAL, L. H. Function of GABAergic and glutamatergic neurons in the stomach. **Journal of Biomedical Science**, v. 12, p. 255-266, 2005.

UCHIYAMA, Y.; TAGAMI, J.; KAMISUKI, S.; KASAI, N.; OSHIGE, M.; CHIKU, H.; IBE, S.; KOIWAI, O.; SUGAWARA, F.; SAKAGUSHI, K. Selective inhibitors of terminal deoxyribonucleotidyltransferase (TdT): Baicalin and genistin. **Biochimica et Biophysica acta**, 2005.

UZUN, H.; SIMSEK, G.; AYDIN, S.; UNAL, E.; KARTER, Y.; YELMEN, N.K.; VEHID, S.; CURGUNLU, A.; KAYA, S. Potential effects of L-NAME on alcohol-induced oxidative stress. **World J Gastroenterol**, v. 11(4), p. 600-604, 2005.

VANDER, A. J.; SHERMAN, J.H.; LUCIANO, D.S. **Human physiology**. 8th ed. Boston: McGraw-Hill, 2001.

VLIETINCK, A.J. ; DE BRUYNE, T. ; APERS, S. ; PIETERS, L.A. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta Med.**, v. 64 (2), p. 97-109, 1998.

WALLACE, J.L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **American Journal of Medicine**, v. 110, n. 1A, p. 19S-23S, 2001

WANG, Q. ; WANG, Y.T. ; PU, S.P; ZHENG, Y.T. Zinc coupling potentiates anti-HIV-1 activity of baicalin. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.324 (2), p. 605 – 10, 2004.

WANG, X.; LI, F.; SUN, Q.; YUAN, J.; JIANG, T.; ZHENG, C. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation and

purification of arctiin from Fructus Arctii. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 247-251, 2005.

ZAYACHKIVSKA, O.S.; KONTUREK, S.J.; DROZDOWICZ, D.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T.; GHEGOTSKY, M.R. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 56 (1), p. 219-231, 2005.

ZHAO, C.M.; CHEN, D.; YAMADA, H.; DORNONVILLE DE LA COUR, C.; LINDSTROM, E.; PERSSON, L.; HAKANSON, R. Rat stomach ECL cells: mode of activation of histidine decarboxylase. **Regulatory Peptides**, v. 114, p. 21– 27, 2003.

ZHENG, Y.; YOKOHIRA, M.; TAKEUCHI, H.; SAOO, K.; YAMAKAWA, K.; MATSUDA, Y.; HOSOKAWA, K.; LI, J. Q.; IKEDA, M.; IMAIDA, K. Lack of significant modifying effect of arctiin on prostate carcinogenesis in probasin/SV40 T antigen transgenic rats. **Cancer**, v. 222, p. 145-151, 2005.